

**BEEINFLUSSUNG DER CUPFERINDUZIERTEN
HÄMOLYSE UND METHÄMOGLOBINBILDUNG
DURCH REDUKTIONSMITTEL**

Brigitte Sprengler

1975



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546706_0028

Dissertationsdruck

Blasaditsch GmbH • 89 Augsburg 17 • Theodor-Heuß-Platz 3 • Telefon (0821) 51 85 63

Aus dem Institut
für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
des Fachbereichs Tiermedizin der Universität München
unter Anleitung von Prof. Dr. A. Schmid

BEEINFLUSSUNG DER CUPFERINDUZIERTEN HÄMOLYSE
UND METHÄMOGLOBINBILDUNG DURCH REDUKTIONSMITTEL

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde des
Fachbereichs Tiermedizin der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Brigitte Sprengler
aus
Landshut

München 1975

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. B. Vollmerhaus
Referent: Prof. Dr. A. Schmid
Korreferent: Prof. Dr. E. Dahme

Tag der Promotion: 21. Februar 1975



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. <u>EINLEITUNG</u>	1
II. <u>LITERATUR</u>	2
1. Morphologie und chemische Bestand- teile der Erythrocytenmembran	2
2. Stoffwechsel der Erythrocyten	5
3. Erythrocytenschädigung durch Oxi- dationsmittel	7
4. Erythrocytenschädigung durch Reduktionsmittel	13
5. Erythrocytenschädigung durch Redoxsubstanzen	20
III. <u>EIGENE UNTERSUCHUNGEN</u>	24
1. Versuchsplan	24
2. Methodik	24
2.1. Versuchstiere	24
2.2. Reagenzien und Lösungen	25
2.3. Versuchsdurchführung	27
2.3.1. Blutgewinnung	27

	Seite
2.3.2. Versuchsansätze; Reduktions- mitteldosierung	27
2.3.3. Inkubation	28
2.4. Stichprobenumfang und Angabe der Versuchsergebnisse	28
3. Ergebnisse	29
3.1. Extinktionsentwicklung durch Natriumacetat und Reduktions- mittel	29
3.2. Extinktionsentwicklung durch Cupfer(II)acetat	40
3.3. Extinktionsentwicklung durch Cupfer(II)acetat und Reduk- tionsmittel	45
3.4. Konzentrationsabhängigkeit der Reduktionsmittelwirkungen	58
IV. <u>DISKUSSION</u>	71
V. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	76
SUMMARY	78
VI. <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	80
VII. <u>LEBENS LAUF</u>	

I. EINLEITUNG

Bei der chronischen Cupfervergiftung wachsender Wiederkäuer entwickelt sich nach langer praktisch symptomloser Latenzzeit eine sogenannte "hämolytische Krise", welche unter anderem durch eine ausgeprägte Hämolyse und Methämoglobinbildung gekennzeichnet ist (11, 86, 87, 93) und meist im Verlauf von einem bis zwei Tagen zum Tod führt. Als unmittelbare Todesursache muß die Methämoglobinbildung mit in Erwägung gezogen werden. Sie stellt deshalb eine dringende Indikation für therapeutische Maßnahmen dar.

Zur Antagonisierung einer Methämoglobinbildung werden Reduktionsmittel verabreicht. Neuere Untersuchungen (78) haben jedoch gezeigt, daß hierzu offensichtlich nicht alle derartigen Stoffe geeignet sind und daß zum Beispiel die häufig empfohlene Ascorbinsäure eine Verstärkung der cupferbedingten Hämolyse und Methämoglobinbildung verursachen kann.

Aus diesem Grunde wurden Untersuchungen über die Beeinflußbarkeit der cupferinduzierten Hämolyse und Methämoglobinbildung durch Reduktionsmittel durchgeführt, die im folgenden beschrieben sind.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Morphologie und chemische Bestandteile der Erythrocytenmembran

Da es bis heute noch nicht gelungen ist, endgültige Aussagen über den Aufbau einer tierischen Zellmembran zu machen, muß man sich mit Modellvorstellungen behelfen. Das klassische Modell einer Zellmembran wurde von DAVSON und DANIELLI (17) entworfen. Sie postulieren, daß es sich hierbei um eine bimolekulare Phospholipidschicht handelt, die an ihrer inneren wie an ihrer äußeren Oberfläche von einem Proteinfilm bedeckt wird. Von dieser Grundvorstellung ausgehend wurden im Laufe der Jahre zahlreiche andere Membranmodelle entworfen und weiterentwickelt (23). Durch elektronenmikroskopische Aufnahmen konnte dann bestätigt werden, daß es sich bei der Erythrocytenmembran um eine mehrschichtige Membran handelt. Sie erscheint als dreiteilige Struktur, welche zwischen zwei dichten, etwa 25 Å starken Linien eine hellere Zone von ebenfalls etwa 25 Å Dicke einschließen (35). Die kontrastarme Mittelschicht soll dabei den Fettsäureketten der Phospholipide entsprechen. Sie wird an beiden Seiten von einer dichteren Schicht begrenzt, welche dem polaren Ende des Phospholipids und den Membranproteinen entsprechen soll (46). Weitere Forschungsergebnisse führten zu der Annahme, daß die Membran nicht einheitlich, sondern mosaikartig aufgebaut sei. Nach WHITTAM (96) soll die Erythrocytenmembran aus einem Mosaik vom Protein-Plaques bestehen, die durch Ca^{++} mit der Phospholipidschicht verbunden sind. Zwischen den Plaques sollen Poren bestehen, durch welche Wasser und Anionen in das Zellinnere eintreten können (25,

67). Über die Verknüpfung der Protein- und Lipoidschicht gibt ein Membranmodell von BIELKA (9) Auskunft. Es besagt, daß diese monomolekularen Schichten wahrscheinlich so angeordnet sind, daß die Proteinfilme die Membran nach außen begrenzen und zwar speziell mit ihren -CO-NH-Ketten; die Seitenketten der Aminosäuren lagern sich nach dem Membraninneren zu. Die inneren Lagen der Membranen sollen durch die beiden Lipoidfilme gebildet werden, wobei die polaren Gruppen der Lipide zu den Proteinen und die hydrophoben Kohlenstoffketten der Lipide im rechten Winkel zur Membranoberfläche orientiert sind. Die apolaren Reste der Lipide sind also nach dem Membraninneren gerichtet.

MEYER und WINKELMANN (64) teilen die Proteine der Membran in zwei Gruppen: in penetrierende Proteine und Proteine, die nur einer Membranhälfte zugehören. Nach ihren Gefrierätzungsuntersuchungen treten die penetrierenden Proteine nicht nur als regelmäßige Bestandteile der Lipoprotein-Untereinheiten auf, sondern sind so in die Membran eingelagert, daß eine Mosaikstruktur resultiert (siehe auch oben). Die Membranproteine lassen sich außerdem in Proteine der äußeren und der inneren Oberfläche unterteilen. Auf der äußeren Oberfläche handelt es sich um Glyko-Proteine, die einer sogenannten "Glykocalyx" zugeordnet werden. Auf der inneren Oberfläche sollen spezielle Proteine vorhanden sein, von denen eines als "Spektrin" bezeichnet wird (73). Das Spektrin soll eine fibröse Struktur aufweisen und 40% des gesamten Membranproteins ausmachen.

Es wird auch als "extrinsic protein" bezeichnet, da es nicht in den hydrophoben Bereich der Lipoidmoleküle

hineinreicht, sondern in das Cytoplasma. Die Proteine der äußeren Membranoberfläche enthalten 60 - 70% Kohlenhydrate davon 1 mg N-acetyl-Neuraminsäure pro Milligramm Protein. Sie werden auch als "intrinsic proteins" bezeichnet, da sie mit der hydrophoben Lipoidschicht in wechselseitiger Beziehung stehen (18). Nach MARCHESI (59) wird dieses Glykoprotein als "Glykophorin" bezeichnet. Das Molekül soll aus einer Polypeptidkette bestehen, die 10% des gesamten Membranproteins ausmacht und mit 20 - 30 Oligosacchariden verknüpft ist. Die Kette kann in drei Segmente eingeteilt werden, die jeweils unterschiedliche chemische Eigenschaften aufweisen und in verschiedenen Regionen der Membran lokalisiert sind. Ihre N-ständige Hälfte, die den gesamten Kohlenhydrat-Anteil enthält, reicht in den Extrazellulärraum, während der C-ständige Rest innerhalb der Lipoidschicht der Membran verankert ist. Dieser "vergrabene" Teil des Moleküls enthält nicht polare Aminosäuren, die mit den Lipiden reagieren.

Unklarheit besteht über die membranständigen Enzyme. Es wird bezweifelt, daß sie echte Membranbestandteile darstellen. Sie sollen vielmehr nur (elektrostatistisch) an die Erythrocytenmembran gebunden sein (25).

Über die neben den Proteinen vorkommenden Membranbestandteile orientiert die folgende Tabelle (34):

Tab. 1: Bestandteile der Erythrocytenmembran

Stoffklasse	% des Trockengewichtes
Proteine	49,2
Gesamtlipide	43,6
Phospholipide	32,5
Cholesterin	11,1
Kohlenhydrate (gesamt)	7,2
N-acetyl-Neuraminsäure	1,2
Hexosamin	2,0
Neutrale Zucker	4,0

Die P h o s p h o l i p i d f r a k t i o n setzt sich zusammen aus etwa 30% Lecithin, 41% Kephalin, 24% Sphingomyelinen, 2% Inositphosphatiden, 1% Lipolecithin und 3% kohlenhydratreichen Lipiden, die aus Gangliosiden und Cerebrosiden bestehen (52,90).

2. Stoffwechsel der Erythrocyten

Die reifen Erythrocyten von Säugern sind Zellen, deren Stoffwechsel sich in mancher Hinsicht von dem anderer Körperzellen unterscheidet.

Sie besitzen keinen Zellkern und sind deshalb weder zur Nucleinsäuren-, noch zur Proteinsynthese befähigt.

Weiterhin fehlen die Mitochondrien und damit auch Citratcyclus und Atmungskette. Die Folge ist, daß die Erythrocyten weder in der Lage sind, den über Acetyl-CoA laufenden Endabbau der Nahrungsbausteine zu bewerkstelligen, noch ihren Energiebedarf aus der quantitativ entscheidenden Endoxidation (Wasserbildung) zu decken.

Der Kohlenhydratstoffwechsel beschränkt sich - wegen Fehlens des Citratcyclus - auf die Glykolyse und den Pentosephosphatcyclus. Sie liefern auch die Stoffwechselenergie der Erythrocyten, woran die Glykolyse zu 90% und der Pentosephosphatcyclus zu 10% beteiligt ist (8, 24, 25). Als Energiequelle dient Glucose, da die Erythrocyten kein Glykogen enthalten. Sie gelangt aus dem Blutplasma offenbar durch Diffusion in die Erythrocyten (8, 24, 25, 57, 89), was eine weitere Besonderheit ihres Stoffwechsels darstellt, da die Glucoseaufnahme in die Zelle in der Regel durch spezifische Transportmechanismen besorgt wird (48). Intrazellulär vorliegende Glucose wird mit Hilfe der Hexokinase in Glucose-6-Phosphat übergeführt, welches das Ausgangssubstrat der Glykolyse und des Pentosephosphatcyclus darstellt.

Bei der Glykolyse werden pro Mol Glucose-6-Phosphat letzten Endes 2 Mol Milchsäure gebildet. Gleichzeitig werden 2 Mol ATP gewonnen und NAD^+ zu NADH reduziert. Das ATP dient unter anderem der Aufrechterhaltung des aktiven Natriumaus- und Kaliumeintransportes (24, 77) durch die Zellmembran und damit der Sicherstellung des optimalen

intrazellulären Ionenmilieus. NADH wird für die Funktion der NADH-abhängigen Methämoglobinreduktase benötigt, dient also der Reduktion spontan entstehenden Hämoglobins zu Hämoglobin (57).

Bei der direkten Glucoseoxidation im Pentosephosphatcyclus wird schließlich Ribulose-5-Phosphat gebildet. Gleichzeitig werden 2 Mol NADP^+ zu NADPH reduziert, das für den Erythrocytenstoffwechsel aus folgenden Gründen von Bedeutung ist: NADPH aktiviert die NADPH-abhängige Methämoglobinreduktase und schützt damit das Hämoglobin vor einer direkten Oxidation. Außerdem stellt NADPH seinen Wasserstoff für die von der Glutathionreduktase katalysierte Glutathionreduktion zur Verfügung. Und reduziertes Glutathion ist für die Lebensfähigkeit der Erythrocyten entscheidend, weil es

- zahlreiche SH-Enzyme (Dehydrogenasen, Kinasen, Phosphatasen) und reduzierte Nicotinamid-Adenin-Dinucleotide vor einer Oxidation schützt sowie
- die oxidative Denaturierung des Hämoglobins zu HEINZ-Körperchen verhindert und Wasserstoffbrücken sowie SH-Gruppen von Strukturproteinen stabilisiert (57).

3. Erythrocytenschädigung durch Oxidationsmittel

Über die Angriffspunkte der Oxidationsmittel an der Erythrocytenmembran und ihre Reaktion mit Membranbestandteilen bzw. Hämoglobin bestehen verschiedene Meinungen, die hier dargelegt werden sollen. Aus der großen Anzahl der Oxidantien wird die Wirkungsweise von Wasserstoffperoxid, Sauerstoff und Chlorat besprochen.

Fügt man Erythrocytensuspensionen W a s s e r s t o f f - p e r o x i d zu oder werden Erythrocyten in vivo hohen Sauerstoffdrücken ausgesetzt, so entstehen an der Membran, dem Hämoglobin und an Enzymen irreversible Schäden, die sich unter anderem in Form von Hämolyse, Methämoglobinbildung, Hämoglobinabbau zu Verdoglobin und Bildung von HEINZ-Körperchen sowie einer Aktivitätsabnahme der Glutathion-peroxidase und einem intrazellulären Konzentrationsabfall von reduziertem Glutathion darstellen (28, 39). Zur Entgiftung von H_2O_2 verfügt der Erythrocyt über ein kompliziertes Abwehrsystem (7, 14), in welchem die beiden Enzyme Katalase und GSH-Peroxidase eine entscheidende Rolle spielen:

Die Katalase zersetzt H_2O_2 auf folgende Weise:



Man kann also sagen, daß sie Wasserstoffperoxid "dehydriert" und reduziert.

Die GSH-Peroxidase katalysiert die Reaktion:



Voraussetzung dieses Entgiftungsmechanismus' ist eine genügend hohe GSH-Konzentration. Sie ist nach dem oben Gesagten (siehe Stoffwechsel) NADPH-abhängig und damit an einen intakten Pentosephosphatcyclus gebunden. Er kann zum Beispiel bei hereditärem Glucose-6-phosphat-dehydrogenase-Mangel und gleichzeitiger Hemmung der verbliebenen Restaktivität durch verschiedene Arzneimittel, darunter Chemotherapeutica wie Primaquine, Pamaquine, Pentaquine, Quinacrine, Sulfanilamid, Sulfoxon und Nitrofurantoin

oder Antibiotica, zum Beispiel Chloramphenicol, gestört sein (56). In solchen Fällen oder bei hohen H_2O_2 -Konzentrationen kommt es zu einer oxidativen Schädigung der Erythrocyten (13, 14, 66).

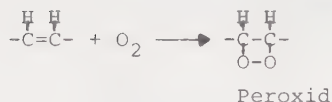
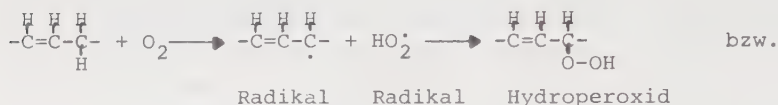
JANDL (42) führt die Schädigung auf eine Oxidation von membranständigen und intrazellulären SH-Gruppen zurück. Die Oxidation der ersteren habe eine erhöhte Membranpermeabilität mit vermehrtem Wassereinstrom, Anschwellen der Zelle und Vergrößerung der Membranporen zur Folge. So komme es zu einem Ausfließen des Hämoglobins. Die Oxidation intrazellulärer SH-Gruppen verursache Methämoglobinbildung und eine Glykolysehemmung mit Abnahme der ATP-Bildung. Die Folge sei unter anderem eine Hemmung des energieabhängigen Natrium-Effluxes aus der Zelle mit osmotischer Hämolyse.

Einen anderen Mechanismus zur Erklärung der Hämolyse durch hohe Sauerstoffdrucke oder Wasserstoffperoxid schlagen MENGEL et al. vor (47, 61, 62, 63). Nach ihren Untersuchungen ist die Lysis der Erythrocyten, in vivo und in vitro, eng verknüpft mit der Bildung von Lipidperoxiden, die zeitlich v o r dem Hämolyseeintritt stattfinden soll.

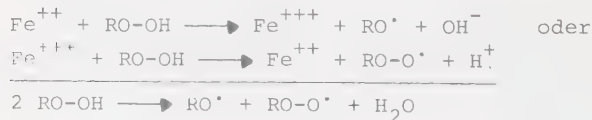
Diese Auffassung ist durch neuere Untersuchungsergebnisse wahrscheinlich gemacht worden. Gerade Erythrocyten sollen besonders oxidationsempfindlich sein. Die Erklärung dafür wird in ihrem hohen Gehalt an polyungesättigten Fettsäuren, besonders in der Phosphatidyläthanolfraktion der Membran (31, 33, 40) gesehen. Es hat sich nämlich gezeigt, daß ungesättigte Verbindungen besonders leicht oxidativ angreifbar sind (58). Der Grund dafür soll unter anderem

die Tatsache sein, daß alle einer Doppelbindung benachbarten C-Atome nur eine schwache Bindung zu ihren Wasserstoffatomen besitzen und dieselben deshalb mit dem Aussenelektron ziemlich leicht abgeben. Hinzu kommt, daß ungesättigte Doppelbindungen auch relativ leicht mit Sauerstoff reagieren (18, 97).

Nach DEMOPOULOS (18) sollen die Initialreaktionen folgendermaßen aussehen:



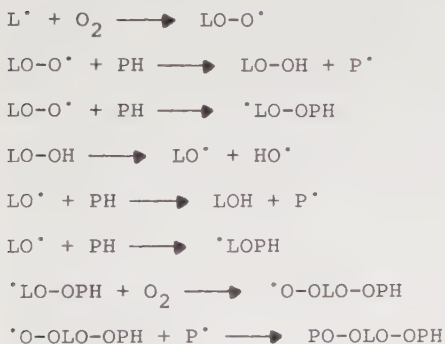
Das Ergebnis ist eine Anhäufung von Radikalen, die wegen ihrer Reaktionsfreudigkeit in Form von Kettenreaktionen weiterreagieren. Die gleichzeitig entstehenden Peroxide und Hydroperoxide können durch Schwermetalle, zum Beispiel Eisen oder Kupfer, auf folgende Weise zu Radikalen umgesetzt werden (70):



Die Reaktionsgleichungen zeigen, daß sowohl die reduzierte als auch die oxidierte Form der Schwermetallionen katalytisch wirken, wobei es zu einem lawinenartigen Auftreten freier aggressiver Radikale kommt.

Die unmittelbaren Folgen einer Lipidperoxidation bestehen in einem Auseinanderbrechen der Kohlenstoffketten und damit einer Leckbildung der Membran (94) mit Ausfließen des Hämoglobins.

Andere Schäden können bei der Reaktion von Radikalen und Lipidperoxiden mit Membranproteinen und -enzymen entstehen. DESAI und TAPPEL (19) stellen sich solche Reaktionen folgendermaßen vor (L: Lipid, PH: Protein):



Dabei kommt es unter anderem zur Vernetzung der Proteine mit Bildung abnormer Membranstrukturen oder zur Spaltung von Polypeptidketten. Auch Aminosäuren können chemisch verändert werden (55, 85). Die Folgen sind Permeabilitätsstörungen der Zellmembran und Aktivitätsverluste der Enzyme (15, 85). Besonders empfindlich sind SH-haltige Proteine bzw. Enzyme (84).

Die gleichen Reaktionen beschreibt auch PRYOR (70), der in seine Überlegungen noch die oben erwähnte Metallkatalyse mit einbezieht.

Die bei diesen Reaktionen entstehenden Reaktionsprodukte sind mit Thiobarbitursäure anfärbbar. Man kann deshalb eine stattgehabte oxidative Gewebeschädigung und deren Ausmaß mit Hilfe der sogenannten Thiobarbitursäurereaktion nachweisen (6).

Ebenso wie die Erythrocytenmembran wird auch das Hämoglobin durch Radikale geschädigt. Sie verursachen sowohl eine Oxidation des Eisens (Methämoglobinbildung) als auch eine Denaturierung des Hämoglobins (HEINZ-Körper-Bildung).

Der Mechanismus der Chloratvergiftung ist seit vielen Jahren wiederholt Gegenstand von Untersuchungen gewesen. JUNG (44) ist der Auffassung, daß Chlorate nach Aufnahme in das Blut lediglich innerhalb des Blutkörperchens wirksam sind. Nach BANASCHAK (4) soll die Chloratwirkung an das Vorhandensein von etwas Methämoglobin gebunden sein, wobei ein instabiler Komplex entsteht, der unter Freisetzung von je einem Chloridion und drei Sauerstoffatomen zerfällt. Diese reagieren sofort mit oxidablen Substanzen, wozu auch das Hämoglobin gehört. In den chloratvergifteten Erythrocyten finden sich dann neben Methämoglobin und Verdoglobin multiple HEINZ-Körperchen. Bei weiterem Fortschreiten des oxidativen Schadens wird auch die Zellmembran in Mitleidenschaft gezogen. Die Zelle verliert ihre Plastizität, wird steif, und Fragmentation mit nachfolgender Hämolyse setzt ein (10, 91).

4. Erythrocytenschädigung durch Reduktionsmittel

Die Erythrocytenschädigung durch Reduktionsmittel hat nach BANASCHAK (4) eine weitaus größere praktische Bedeutung als die durch Oxidationsmittel. Man zählt zu dieser Stoffgruppe Substanzen wie Arsenwasserstoff, reduzierte Metallionen, Ascorbinsäure, Phenylhydrazin, Nitrit, aromatische Nitro- und Aminoverbindungen und viele andere mehr.

Für alle Reduktionsmittel wird ein grundlegend gleicher Wirkungsmechanismus vorgeschlagen. Entweder reagieren sie mit hämoglobingebundenem Sauerstoff oder mit Luftsauerstoff in einer sogenannten "gekoppelten Oxidation", wobei intermediär Wasserstoffperoxid entsteht, das dann für die oxidative Schädigung der Erythrocyten verantwortlich gemacht wird (4).

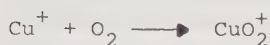
Die erythrocytenschädigende Wirkung reduzierter Metallionen ist von FIELDING (22) am Beispiel des Fe^{++} gezeigt worden. Seine Versuche ergaben, daß schon kleine Mengen dieses Ions in vitro Hämolyse hervorrufen. Daß dabei das Metallion das schädigende Agens war, ergibt sich aus der Beobachtung, daß die Hämolyse durch Chelatbildner abzuschwächen oder zu verhindern war (22, 60). Die hämolytische Wirkung von Cu^+ ist von SMITH und DUNKLEY (81) beschrieben worden.

Als Wirkungsweise reduzierter Metallionen wurde eine katalytische Beeinflussung der Autoxidation ungesättigter Fettsäuren in der Erythrocytenmembran vermutet (60). Wahrscheinlich läuft der Mechanismus jedoch über radika-

lische Intermediärprodukte, deren Entstehung aus Hydroperoxiden (und Peroxiden) in dem bereits oben erläuterten Sinn katalysiert wird. Für diese Interpretation sprechen zum Beispiel Versuche mit Kindern (16), welche ergaben, daß Eisendextran bei einem Mangel an radikalquenchendem Vitamin E sowohl die Lipidperoxidation als auch die Hämolyserate erhöht. Zu vergleichbaren Resultaten kamen auch SMITH und MENGEL (82) bei Versuchen mit Vitamin E arm ernährten Mäusen. Sie stellten fest, daß Eisendextran bei ihren Versuchstieren toxischer war, einen höheren Lipidperoxidgehalt induzierte und unter hohem Sauerstoffpartialdruck schneller Hämolyse verursachte als bei normal ernährten Kontrollmäusen. SMITH und MENGEL interpretieren die Hämolyse als Folge der Lipidperoxidation, welche zum Zerreißen von Kohlenstoffketten mit Lochbildung in der Zellmembran, Permeabilitätsänderung und Lysis führe. Derselbe Mechanismus wird auch bei der Schädigung von Mitochondrien- und Mikrosomenmembranen durch Metallionen angenommen (36, 37). Als weitere Folgen einer Lipidperoxidation kommen eine Schädigung von Zellproteinen, Enzymen und des Zellstoffwechsels in Betracht (2, 19, 55). Die hämolytische Wirkung von Cu(I)-Ionen wird von SMITH und DUNKLEY (81) gleichfalls mit einer Radikalinduktion erklärt. Sie schlagen dafür folgenden Reaktionsablauf vor (LH: Lipid):



mit Fortsetzung nach Reaktion (d) und (e). Dieser Ablauf könnte auch die von SCHMID (78) beobachtete Stimulation der cupferbedingten Hämolyse und Methämoglobinbildung durch Ascorbinsäure und andere Reduktionsmittel auf folgende Weise erklären (AH_2 : Ascorbinsäure):



mit Fortsetzung nach Reaktion (b) (12). Reduktionsmittel reduzieren demnach das oxidierte Cupfer(II)-Ion und führen es dadurch in die radikalinduzierende Form über (27, 79). Als Folge der Radikalwirkungen wird unter anderem eine Hemmung von Enzymen des Pentosephosphatcyclus und der Glykolyse mit Konzentrationsabnahme von ATP, reduzierten Nicotinamid-Adenin-Dinucleotiden sowie reduziertem Glutathion, Hemmung der physiologischen Methämoglobinreduktion, Oxidation membranständiger SH-Gruppen und Denaturierung (Vernetzung) des Hämoglobins diskutiert (20, 21, 68).

Als Mechanismus der Methämoglobinbildung durch Cupfer sind zwei Möglichkeiten denkbar (83):

1. eine Oxidation durch cupferinduzierte Radikale sowie das entstehende H_2O_2 (siehe Reaktion (c)) und/oder
2. eine direkte Oxidation des Hämoglobins mit anschließender Oxidation des dabei gebildeten Cupfer(I)-Ions durch Sauerstoff.

Neben der erwähnten Stimulation der Cupferwirkung ist auch eine Erythrocytenschädigung durch A s c o r b i n - s ä u r e allein bekannt. Da ihr Mechanismus bisher noch nicht geklärt ist, können zur Zeit nur Hypothesen dargestellt werden:

LEMBERG (54) schlägt die Bildung von Wasserstoffperoxid bei einer Autoxidation der Ascorbinsäure in Gegenwart von Sauerstoff als Ursache der Schädigung vor. Für noch wahrscheinlicher hält er aber eine direkte Reaktion zwischen Ascorbinsäure und Hämoglobin, gefolgt von der intermediären Entstehung eines instabilen Hämoglobin-Ascorbinsäurekomplexes, welcher dann unter Bildung von Verdoglobin zerfalle. Der Mechanismus soll so lange ablaufen bis alle Ascorbinsäure aufgebraucht sei.

Ganz ähnlich sind die Vorstellungen von MILLS (65, 66), der eine Reaktion zwischen Ascorbinsäure und hämoglobin-gebundenem Sauerstoff annimmt, wobei entweder Wasserstoffperoxid allein oder ein intermediärer H_2O_2 -Komplex entstehe.

In grundsätzlicher Übereinstimmung mit diesen Hypothesen führen HUNTER (37) und LAMBDEN (53) die durch Ascorbinsäure hervorgerufene Hämolyse auf eine Peroxidation der Membran durch Peroxide zurück.

Als nächstes Beispiel soll die Schädigung von Erythrocyten durch N i t r i t erläutert werden. Nach REIN und JUNG (43, 72) reagiert Nitrit zunächst mit Hämoglobin unter Bildung eines instabilen Komplexes, welcher über Zwischenstufen mit Anlagerung von zwei Protonen und inermolekularer Ladungsverschiebung zur Bildung eines

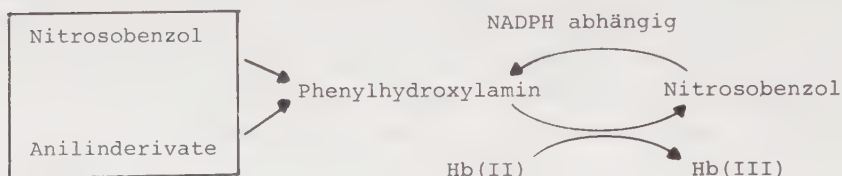
intermediären Nitrosohämglobin-Komplexes (Hb(III)-NO) führt, der dann spontan zu Methämoglobin und NO^- zerfällt.

Das Nitroxid-Ion reagiert nun wieder mit Hämoglobin oder es wird durch molekularen Sauerstoff zu Nitrit und Nitrat oxidiert. In vitro erzeugt Nitrit Methämoglobinbildung, Senkung des Glutathion-Gehaltes und damit Aktivitätsverlust der SH-Enzyme und Entstehung von Verdoglobin und HEINZ-Körperchen. Einen Hinweis dafür, daß Nitrit Oxihämoglobin als Co-Faktor benötigt, erbringen HOCHSTEIN, MARTINEZ und COHEN (32), indem sie zeigen, daß Nitrit nur so lange H_2O_2 intermediär bilden kann, bis das gesamte Oxihämoglobin aufgebraucht ist; danach hilft das Nitrit mit, das gebildete H_2O_2 zu entgiften.

Als reduzierende erythrocytenschädigende aromatische Nitro- und Aminoverbindungen gelten vor allem Anilin, Nitrobenzol und Phenylhydrazin. Die Wirkung von Anilin und Nitrobenzol wird in vivo durch ihre Metaboliten Phenylhydroxylamin bzw. Nitrosobenzol hervorgerufen (49). Die Schlüsselreaktion ihrer Blutgiftwirkung ist die Oxidation von Phenylhydroxylamin zu Nitrosobenzol. Dabei entstehen intermediär Wasserstoffperoxid und $\text{C}_6\text{H}_5\text{NHO}\cdot$ -Radikale, die für die gleichzeitige Methämoglobinbildung, Weiteroxidation des Blutfarbstoffes zu Verdoglobin und Ausfällung von HEINZ-Körperchen und Hämolyse verantwortlich gemacht werden (50, 88).

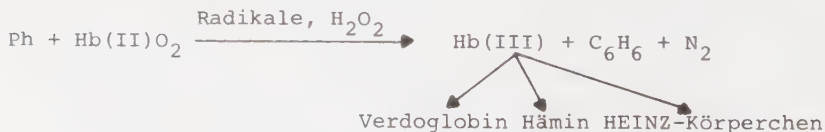
Die große Giftigkeit von Anilin und Nitrobenzol beruht darauf, daß das Nitrosobenzol durch die NADPH abhängige Methämoglobinreduktase wieder zu Phenylhydroxylamin reduziert werden kann, wobei das NADPH durch die Dehydrogen-

asereaktion im Pentosephosphatcyclus des Erythrocytenstoffwechsels bereitgestellt wird. Dadurch wird ein Kreisprozeß unterhalten, der auf einer katalytischen Umsetzung großer Blutfarbstoffmengen durch eine relativ kleine Menge Phenylhydroxylamin bzw. Nitrosobenzols beruht (4) (Hb(II): Hämoglobin, Hb(III): Methämoglobin):



Über die Wechselwirkung zwischen der roten Blutzelle und Phenylhydrazin bestehen verschiedene Auffassungen.

Nach BANASCHAK (4) reagiert Phenylhydrazin (Ph) mit Oxi-hämoglobin (Hb(II)O_2), wobei dieses zu Methämoglobin (Hb(III)) und Phenylhydrazin zu Benzol und Stickstoff umgesetzt wird. Die Intermediärreaktionen sind noch weitgehend ungeklärt, scheinen aber über radikalische Zwischenstufen und Wasserstoffperoxid zu laufen. Dabei kommt es nicht nur zur Methämoglobinbildung, sondern auch zu dessen Abbau zu Verdoglobulin und Hämin sowie zur HEINZ-Körper-Bildung.



Nach SCHEUCH und RAPOPORT (75) beruht die Phenylhydrazinwirkung auf einer Oxidation des Hämoglobins und des reduzierten Glutathions. Als Folge wird eine Wechselwirkung zwischen dem oxidierten Glutathion und SH-haltigen Enzymen des Erythrocyten angegeben, die zu schweren Veränderungen der Zellmorphologie und -funktion führe. SCHEUCH und RAPOPORT (75) sind der Auffassung, daß das oxidierte Glutathion (GSSG) als Oxidationsmittel weiterreagiert und mit den SH-Gruppen von Enzymen (E-SH) gemischte Disulfide bildet:



Diese Zwischenformen sollen sehr labil sein. Wenn sie nicht schnell enzymatisch (in vitro durch Cystein oder Glutathion) rückgebildet werden, unterliegen sie innerhalb von Stunden irreversiblen Veränderungen. Ein Beispiel dafür ist die so zustandekommende Inaktivierung der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, deren Ausfall erwiesenermaßen zu erhöhter Hämolysebereitschaft führt (57). Die Folge der Inhibition SH-haltiger Enzyme ist nach JACOB und JANDL (38) letzten Endes eine sogenannte "osmotische Hämolyse".

Ebenfalls auf der Oxidation reduzierten Glutathions und der Inaktivierung von SH-Enzymen soll nach LÖHR, BAUMANN und KAMM (56) die Erythrocytenschädigung durch Phenylhydrazin beruhen. Sie erläutern auch die HEINZ-Körper-Bildung anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen: Danach werden die Körperchen im Innern der Zelle gebildet und wandern dann durch die Zelle, um schließlich an der Membran fixiert zu werden. Die Ursache soll eine Bindung zwischen den SH-Gruppen des denaturierenden Hämoglobins und den SH-Gruppen der Zellmembran sein. Als Folge wer-

den erhöhte Membran-Rigidität, osmotischer Stress und frühzeitige Hämolyse genannt (41).

BEUTLER (8) sowie ALLEN und JANDL (1) stellen nach Untersuchungen mit Phenylhydrazin eine Abnahme des Gehaltes an reduziertem Glutathion und damit verbunden einen Aktivitätsverlust von Enzymen (71, 74) und Hämolyse fest.

Die Wirkung von A r s e n w a s s e r s t o f f auf die rote Blutzelle wird folgendermaßen beschrieben: Mit der Hilfe der katalytischen Wirkung des Hämoglobins wird Arsenwasserstoff durch den Hämoglobin-gebundenen Sauerstoff oxidiert und es entsteht intermediär Wasserstoffperoxid, das rückwirkend zur Bildung von Verdoglobin und zur Denaturierung des Hämoglobins führt (45). Das denaturierte Verdoglobin polymerisiert über H-Brücken und präzipitiert in Form der sogenannten "HEINZ-Körper" (41, 56). Die zwischen dem Präzipitat, dem in der Zelle enthaltenen Glutathion und den SH-Gruppen der Zellmembran entstehenden Disulfidverbindungen sollen für ein Starrwerden der Membran mit nachfolgender Fragmentation und Hämolyse verantwortlich sein.

5. Erythrocytenschädigung durch Redoxsubstanzen

Eine wichtige Rolle unter den Erythrocytengiften spielen Verbindungen, die Redoxsysteme darstellen und in vivo relativ leicht zwischen einer reduzierten und einer oxidierten Form wechseln können. Dadurch kann die Oxidation des Blutfarbstoffes stark beschleunigt werden (4). Einige Beispiele sind die Farbstoffe Methylenblau, Toluidinblau,

die Chinone und Chinonimine oder Stoffe, die in Chinone oder Chinonimine übergehen können wie zum Beispiel Polyphenole, Aminophenole, Primaquin und einige andere Antimalariamittel.

M e t h y l e n b l a u ist ein Farbstoff, der in der Klinik mit Erfolg zur Rückbildung von Methämoglobin eingesetzt wird, unter Umständen jedoch auch HEINZ-Körperbildung, Glutathion-Verlust, Hämolyse und sogar Methämoglobinbildung verursachen kann (29).

Untersuchungen von BANASCHAK und HÄNEL (3) zeigen, daß Methylenblau zunächst an die Erythrocytenoberfläche fixiert wird. Danach wird der Farbstoff durch die NADPH-abhängige Methämoglobinreduktase (Hb(III)-Reduktase) zu Leucomethylenblau reduziert, das als lipoidlösliche Substanz in die Zelle eindringt (3) und Methämoglobin (Hb(III)) zu Hämoglobin (Hb(II)) reduziert:

Methylenblau $\xrightarrow{\text{NADPH, Hb(III)-Reduktase}}$ Leucomethylenblau

Leucomethylenblau + Hb(III) $\xrightleftharpoons{\hspace{1.5cm}}$ Methylenblau + Hb(II) (69).

Eine Erklärung für die hämolysierende Wirkung des Methylenblaus ist die Erniedrigung der Reduktionsrate des oxidierten Glutathions durch Konkurrenz um den im Pentosephosphatcyclus anfallenden Wasserstoff des NADPH. Das auf diese Weise angestaute oxidierte Glutathion soll SH-haltige Enzyme in der Zelle inaktivieren (76). Das Endresultat dieser Vorgänge ist eine "osmotische Hämolyse" (30, 42, 76) und wahrscheinlich auch eine HEINZ-Körperbildung.

Zur Methämoglobinbildung durch Methylenblau und anderen Redoxsubstanzen kann es kommen, wenn die Methämoglobinkonzentration in Erythrocyten sehr niedrig ist, das heißt, wenn diese Stoffe unter physiologischen Verhältnissen appliziert werden. Das erklärt sich dadurch, daß Redoxsubstanzen - wie das vorstehende Reaktionsschema zeigt - ein Fließgleichgewicht zwischen Hämoglobin und Methämoglobin einstellen. Dieses wird bei niedriger Methämoglobinkonzentration im Sinne einer Methämoglobinbildung verschoben. Hinzu kommt, daß Leucomethylenblau auch durch Sauerstoff (nicht nur Methämoglobin) zu Methylenblau oxidiert werden kann (51). Unter physiologischen Bedingungen mit hoher intrazellulärer Sauerstoffspannung ergibt sich dadurch eine Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes nach links, das heißt, im Sinne einer Leucomethylenblau- aber auch einer Methämoglobinbildung.

Diese Überlegungen zeigen, daß die therapeutische Verwendbarkeit einer Redoxsubstanz zur Reduktion von Methämoglobin entscheidend von der Lage des Fließgleichgewichtes zwischen Hämoglobin und Methämoglobin abhängt.

Schon seit langer Zeit kennt man die erythrocytenschädigende Wirkung der Antimalariamittel P r i m a q u i n oder P a m a q u i n . Sie zählen zur Gruppe der 8-Amino-Chinoline (genau 8(4Amino-1-methylbutylamino)-6-Methoxychinolin), welche durch metabolische Umsetzung im Organismus in Chinonimine übergeführt werden. Bei diesen handelt es sich um Redoxsubstanzen (4).

Im Erythrocyten katalysieren sie einen Elektronentransfer von Zellbestandteilen auf molekularen Sauerstoff.

Dabei entstehen oxidierende freie Radikale und Wasserstoffperoxid (39). Die Folgen der endogenen Radikal- und Wasserstoffperoxidbildung sind wiederum Zerstörung der Membran via Lipidperoxidation und Oxidation des Hämoglobins zu Hämoglobin (5, 26).

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. Versuchsplan

Die eigenen Untersuchungen wurden mit dem Ziel durchgeführt, Aufschluß über die Beeinflussung der cupferinduzierten Hämolyse und Methämoglobinbildung durch Reduktionsmittel zu erhalten. Versuchsparameter waren die Extinktionsänderungen bei 542 nm (Hämolyse) und 626 nm (Methämoglobinbildung) von zellfreien Blutverdünnungen nach Inkubation mit

- a. Natriumacetat
- b. Natriumacetat plus Reduktionsmitteln
- c. Cupferacetat und
- d. Cupferacetat plus Reduktionsmitteln

wobei durch Vergleich der experimentellen Fragestellungen a, b, c und d folgende Aussagen über Hämolyse und Methämoglobinbildung erwartet wurden:

b-a: Reduktionsmittelwirkung

c-a: Cupferwirkung und

d-((b-a)+(c-a)): Reduktionsmitteleinfluß auf die Cupferwirkung.

2. Methodik

Die Untersuchungen sind auf folgende Weise durchgeführt worden:

2.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten konventionell gehaltene und ernährte 392 ± 42 g ($\bar{x} + s_x$) schwere männliche Sprague Dawley Ratten aus der Zucht des Instituts für Pharmakologie, Toxikologie und

Pharmazie, denen 16 Stunden vor Versuchsbeginn das Futter entzogen worden war. Wasser stand uneingeschränkt zur Verfügung.

2.2. Reagenzien und Lösungen

Bei den verwendeten Reagenzien handelt es sich, soweit erhältlich, um handelsübliche Analysen- oder Syntheseware. Zur Herstellung der Lösungen wurde, wenn nicht anders angegeben, aqua dest. verwendet. Prozentuale Konzentrationsangaben beziehen sich auf Substanzgewicht pro Lösungsmittelvolumen.

Im einzelnen wurden verwendet bzw. hergestellt:

- Butyliertes Hydroxyanisol (BHA): $C_{11}H_{16}O_2$
(Gemisch aus 2-tert- und 3-tert-Butyl-4-methoxyphenol)
EGA-CHEMIE, Steinheim
- Kupfer(II)acetat: $(CH_3COO)_2Cu \cdot 3H_2O$
MERCK, Darmstadt
- Eisen(II)chlorid: $FeCl_2 \cdot 4H_2O$
MERCK, Darmstadt
- Glucose: $C_6H_{12}O_6$
MERCK, Darmstadt
- Glutathion reduziert: $C_{10}H_{17}N_3O_6S$
MERCK, Darmstadt
- Heparin sodium USP XVIII (160000 IE/g)
ROTH, Karlsruhe
- Hydrochinon: $C_6H_6O_2$
MERCK, Darmstadt
- Hydroxylammoniumchlorid: $NH_2OH \cdot HCl$
MERCK, Darmstadt

- Natriumacetat: $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
MERCK, Darmstadt
- Natriumascorbat: $\text{C}_6\text{H}_7\text{NaO}_6$
MERCK, Darmstadt
- Natriumchlorid: NaCl
MERCK, Darmstadt
- Natriumselenit: $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
MERCK, Darmstadt
- Pentosanpolyschwefelsaures Natrium
BENE-CHEMIE, München
- Thiobutabarbital Natrium: $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{NaN}_2\text{O}_2\text{S}$
PROMONTA, Hamburg
- Vitamin A-Acetat: $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_2$
FLUKA, Buchs/Schweiz
- Vitamin B₁: $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{OSHCl}$
FLUKA, Buchs/Schweiz
- Vitamin C: $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$
MERCK, Darmstadt
- Äthanol: $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$; min. 96 Vol%ig
MERCK, Darmstadt
- Cupfer(II)acetatlösung: $12,5845 \cdot 10^{-4}$ molar
- Heparinlösung: 1,5%ig
- Natriumacetatlösung: $25,1690 \cdot 10^{-4}$ molar

- Natriumchloridlösung: 0,9 %ig
- Pentosanpolyschwefelsaures Natrium-Lösung: 5 %ig
als Thrombocid^(R), BENE-CHEMIE, München
- Propandiol-(1,3): $C_3H_8O_2$; 96 Vol%ig, MERCK, Darmstadt
- Thiobutabarbitallösung: 4 %ig
als Inactin^(R), PROMONTA, Hamburg
- Vitamin E-Acetat-Lösung: $C_{31}H_{52}O_3$; 5 %ig
MERCK, Darmstadt

2.3 Versuchsdurchführung

Zur Versuchsdurchführung wurden die Versuchstiere entblutet, das Blut verdünnt, mit den Versuchssubstanzen versetzt, bei konstanter Temperatur inkubiert und zur Beurteilung der Hämolyse und Methämoglobinbildung photometriert.

2.3.1. Blutgewinnung

Das Blut der Versuchstiere wurde in Allgemeinanästhesie (0,25 ml Thiobutabarbitallösung pro 100 g Körpergewicht ip) unter Verwendung eines mit Thrombocid^(R) benetzten Katheders aus der A. abdominalis nach WEIGERT (92) gewonnen und in Zentrifugengläsern (Volumen 25 ml) mit Heparinlösung gemischt (0,3 ml ad 5 ml Blut).

2.3.2. Versuchsansätze; Reduktionsmitteldosierung

Die Versuchsansätze bestanden aus 2,5 ml ungerinnbarem Blut, das 1:11 mit Natriumchloridlösung verdünnt und 9/10 mit Natriumacetat- (Kontrolle) bzw. Cupferacetatlösung versetzt wurde, so daß das Endvolumen 30,55 ml betrug.

Bei Zusatz von Reduktionsmitteln wurden diese in 1 ml Kochsalzlösung gelöst und gegen 1 ml Kochsalzlösung des Ansatzes

unmittelbar vor Versuchsbeginn ausgetauscht. Der Reduktionsmittelzusatz erfolgte so, daß die Endkonzentration im Ansatz $1,258 \cdot 10^{-4}$ molar war und damit der Endkonzentration des Cupferacetats entsprach. Das in Wasser schwer lösliche Vitamin A bzw. Hydroxyanisol wurde erst in 0,05 ml Primasprit bzw. Propylenglykol gelöst und dann ad 1 ml Kochsalzlösung aufgefüllt. Diese Zusätze waren auch in den Kontrollansätzen enthalten.

2.3.3. Inkubation

Die Versuchsansätze wurden unmittelbar nach ihrer Herstellung bis zu 4 Stunden lang bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Während der Inkubation wurden nach 0, 1, 2, 3 und 4 Stunden je 5 ml Ansatz entnommen, 5 Minuten lang bei 3000 U/min und der Überstand nochmals 5 Minuten lang bei 6000 U/min zentrifugiert. Mit dem zweiten Überstand erfolgte eine photometrische Extinktionsbestimmung gegen aqua dest. bei 542 nm und 626 nm mit einem ZEISS-Spektralphotometer PMQ II unter Verwendung von Glasküvetten von 1 cm Schichtdicke sowie einer Spaltbreite von 0,04 mm.

2.4. Stichprobenumfang und Angabe der Versuchsergebnisse

Zur Abklärung jeder einzelnen experimentellen Fragestellung (Beispiel: Ansätze mit Cupferacetat plus Hydrochinon) wurde je 1 Blutverdünnung von 10 Versuchstieren untersucht. Die Ergebnisse sind als arithmetischer Mittelwert ($\bar{x}$) und dessen Standardabweichung (s_x) nach rechnerischer Korrektur der unspezifischen Extinktion der Einzelwerte zum Inkubationszeitpunkt $t = 0$ angegeben.

3. Ergebnisse

Im folgenden sind die experimentell gewonnenen Ergebnisse in Tabellenform zusammengefaßt und graphisch veranschaulicht.

3.1. Extinktionsentwicklung durch Natriumacetat und Reduktionsmittel

Die Extinktionsentwicklung durch Natriumacetat bzw. Natriumacetat plus Reduktionsmittel bei 542 nm (E_{542}) sowie 626 nm (E_{626}) geht aus den Tabellen 2 und 3 sowie den Abbildungen 1 und 3 hervor.

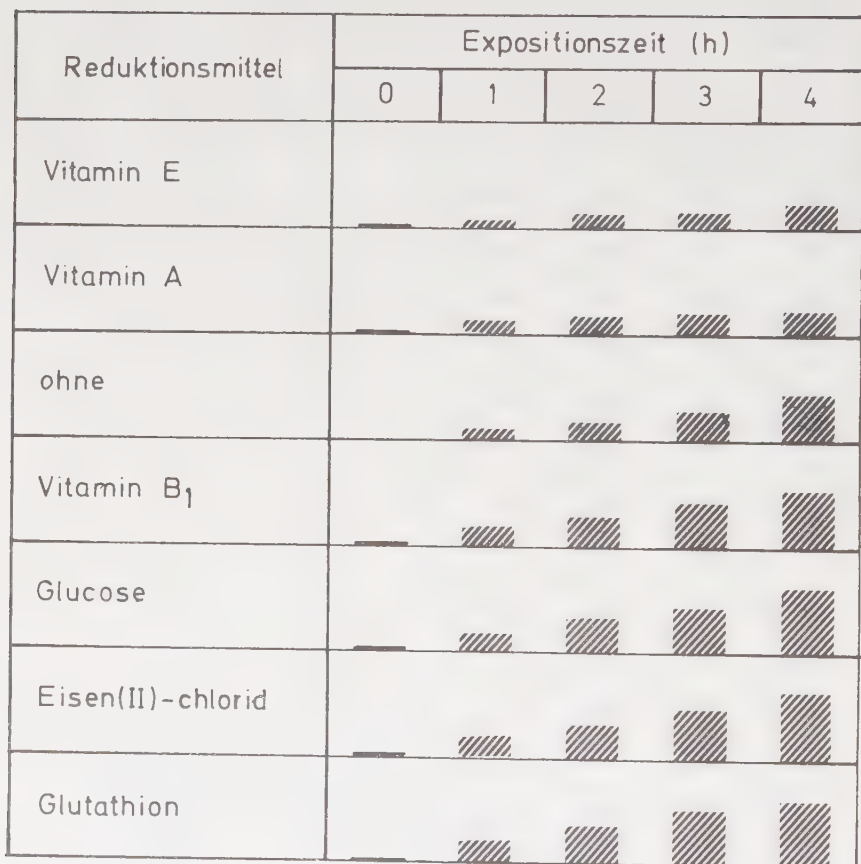
Tab. 2: E₅₄₂ bei Zusatz von Natriumacetat und Natrium-
acetat plus Reduktionsmitteln

Reduktions- mittel	Expositionszeit (h)				
	0	1	2	3	4
Vitamin E	0,011 0,011	0,034 0,012	0,044 0,014	0,058 0,012	0,091 0,010
Vitamin A	0,016 0,008	0,049 0,008	0,062 0,009	0,071 0,009	0,089 0,008
ohne	0,000 0,010	0,041 0,008	0,069 0,009	0,110 0,012	0,175 0,022
Vitamin B ₁	0,006 0,007	0,071 0,010	0,110 0,013	0,165 0,017	0,216 0,017
Glucose	0,014 0,005	0,075 0,007	0,130 0,008	0,177 0,009	0,253 0,012
Eisen(II)- chlorid	0,010 0,009	0,079 0,018	0,131 0,020	0,189 0,026	0,265 0,030
Glutathion	0,009 0,006	0,095 0,008	0,152 0,020	0,205 0,018	0,257 0,023
Vitamin C	0,028 0,011	0,108 0,015	0,168 0,018	0,234 0,021	0,298 0,023
Natrium- selenit	0,001 0,007	0,092 0,012	0,161 0,014	0,243 0,014	0,340 0,021
Hydroxy- anisol	0,054 0,007	0,150 0,012	0,195 0,012	0,217 0,129	0,267 0,014
Natrium- ascorbat	0,024 0,009	0,108 0,174	0,185 0,023	0,255 0,028	0,352 0,029
Hydrochinon	0,007 0,010	0,091 0,013	0,200 0,024	0,269 0,047	0,370 0,067
Hydroxyl- ammonium	-0,006 0,005	0,135 0,011	0,210 0,013	0,301 0,018	0,388 0,010

Tab. 3: E₆₂₆ bei Zusatz von Natriumacetat und Natrium-
acetat plus Reduktionsmitteln

Reduktions- mittel	Expositionszeit (h)				
	0	1	2	3	4
Vitamin B ₁	0,000 0,000	0,004 0,000	0,006 0,000	0,010 0,000	0,014 0,000
Vitamin E	0,000 0,000	0,003 0,000	0,007 0,000	0,010 0,000	0,014 0,001
ohne	0,000 0,000	0,004 0,000	0,007 0,000	0,010 0,000	0,016 0,002
Vitamin A	0,004 0,000	0,006 0,000	0,008 0,000	0,009 0,000	0,012 0,000
Natrium- selenit	0,000 0,000	0,005 0,000	0,007 0,000	0,010 0,000	0,018 0,000
Glucose	0,001 0,000	0,004 0,000	0,009 0,000	0,011 0,000	0,016 0,000
Glutathion	0,000 0,000	0,005 0,000	0,009 0,001	0,012 0,001	0,016 0,002
Hydroxy- anisol	0,001 0,000	0,006 0,000	0,009 0,001	0,011 0,001	0,015 0,001
Natrium- ascorbat	0,000 0,000	0,004 0,000	0,009 0,000	0,013 0,001	0,022 0,002
Vitamin C	-0,001 0,000	0,006 0,000	0,010 0,000	0,015 0,000	0,019 0,000
Eisen(II)- chlorid	0,000 0,000	0,005 0,000	0,008 0,001	0,015 0,002	0,022 0,002
Hydrochinon	0,001 0,000	0,007 0,000	0,014 0,001	0,019 0,001	0,028 0,003
Hydroxyl- ammonium	0,003 0,001	0,014 0,001	0,021 0,001	0,031 0,002	0,044 0,002

Abb. 1: E₅₄₂ bei Zusatz von Natriumacetat und Natriumacetat plus Reduktionsmitteln



Reduktionsmittel	Expositionszeit (h)				
	0	1	2	3	4
Vitamin C					
Natriumselenit					
Hydroxyanisol					
Natriumascobat					
Hydrochinon					
Hydroxylammonium					

 : E = 0,1

Zur Entscheidung der Frage, ob im Extinktionsverlauf während der Inkubationszeit zwischen den einzelnen Zusätzen Unterschiede bestehen, wurde ein statistisches Verfahren zur Kurvendiskriminierung nach WINNE (95) herangezogen. Das Auswertungsergebnis ist in Abbildung 2 dargestellt. Sie zeigt die Summe der Extinktionen der fünf erfaßten Meßzeitpunkte in Säulenform, wobei signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) durch Abstände zwischen den Säulen kenntlich gemacht sind.

Aus Abbildung 2 geht hervor, daß der Zusatz von Vitamin E bzw. Vitamin A die E_{542} signifikant erniedrigt, während alle übrigen Zusätze eine Extinktionszunahme machen, wobei Hydroxyanisol, Natriumascorbat, Hydrochinon und Hydroxylammonium als stärkste Stimulantien auffallen.

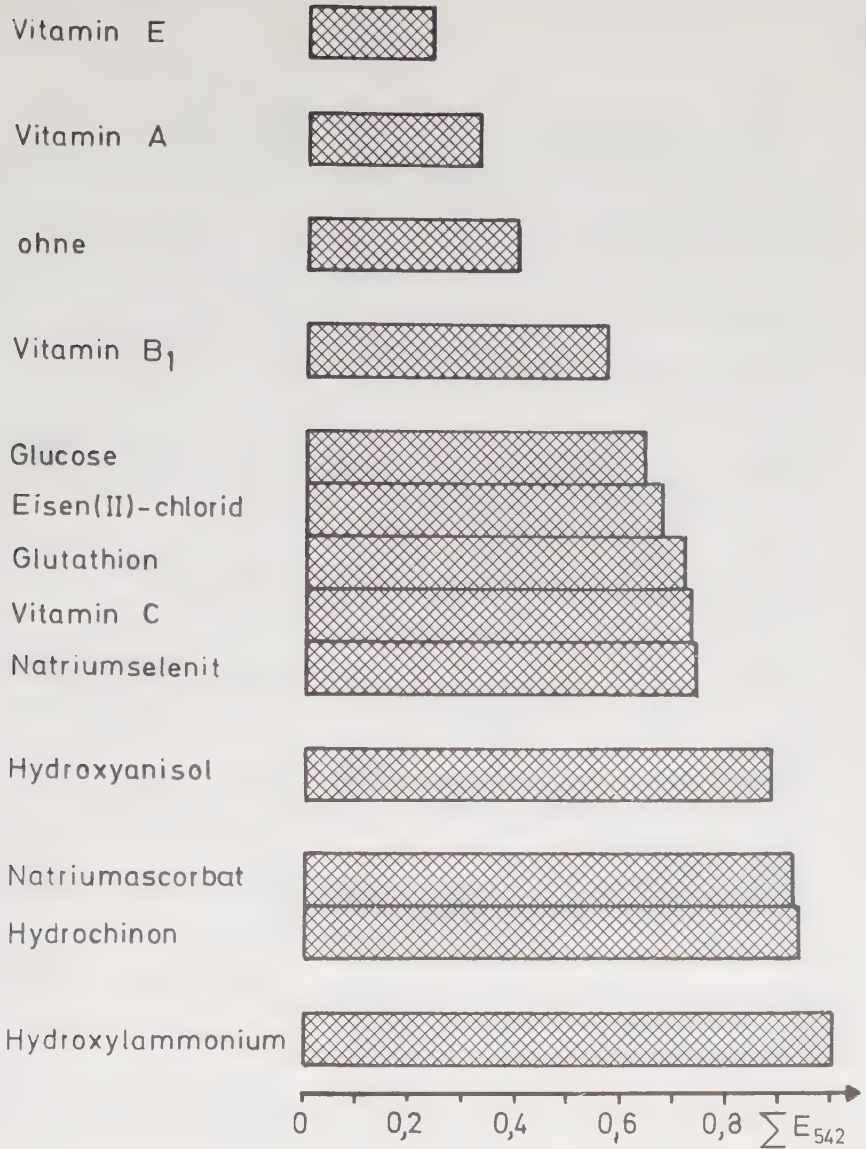


Abb. 2: Statistische Auswertung von Tabelle 2 (Säulenabstände kennzeichnen signifikante Unterschiede)

Abb. 3: E₆₂₆ bei Zusatz von Natriumacetat und Natriumacetat plus Reduktionsmitteln

Reduktionsmittel	Expositionszeit (h)				
	0	1	2	3	4
Vitamin B ₁					
Vitamin E					
ohne					
Vitamin A					
Natriumselenit					
Glucose					
Glutathion					

Reduktionsmittel	Expositionszeit (h)				
	0	1	2	3	4
Hydroxyanisol					
Natriumascorbat					
Vitamin C					
Eisen(II)-chlorid					
Hydrochinon					
Hydroxylammonium					

 : E = 0,01

Tabelle 3 wurde in gleicher Weise ausgewertet wie Tabelle 2. Das Ergebnis ist in Abbildung 4 dargestellt. Sie zeigt im wesentlichen das gleiche Bild wie Abbildung 2.

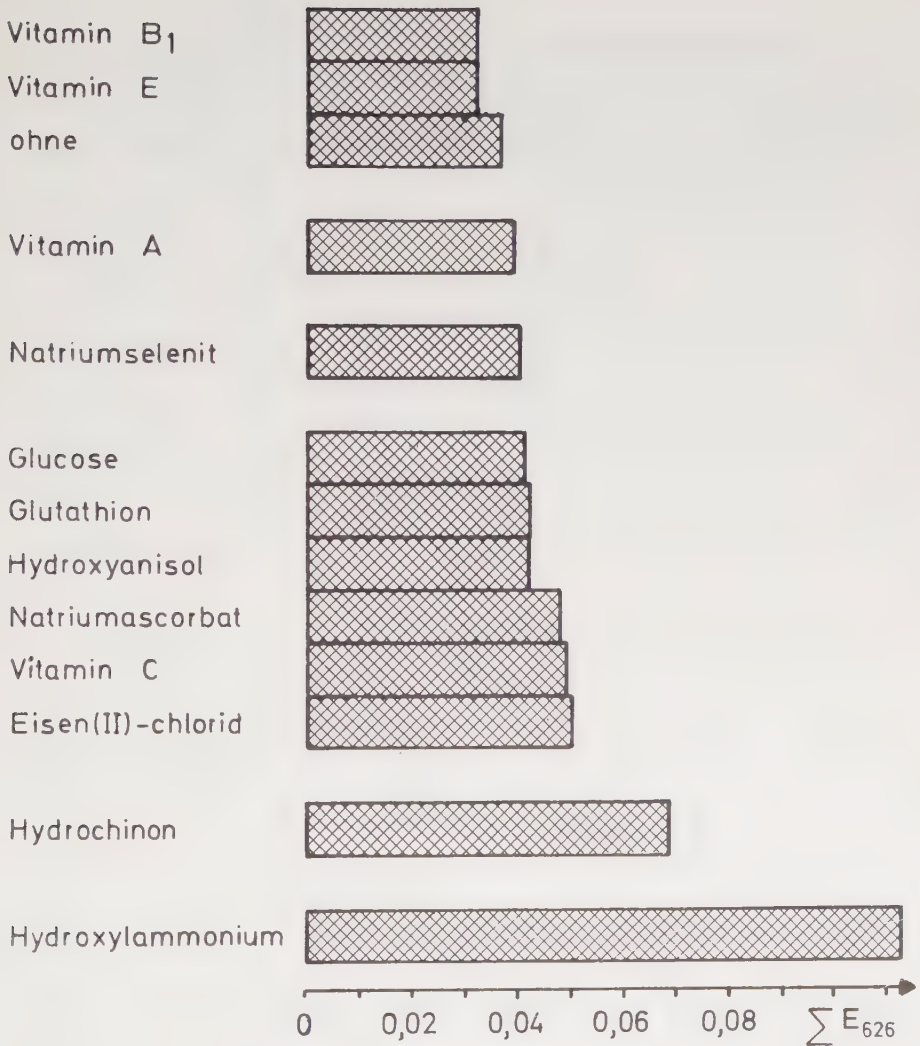


Abb. 4: Statistische Auswertung von Tabelle 3 (Säulenabstände kennzeichnen signifikante Unterschiede)

3.2. Extinktionsentwicklung durch Cupfer(II)acetat

Die Entwicklung der E_{542} bzw. E_{626} bei Zusatz von Cupfer (II)- sowie Natriumacetat (Kontrolle) geht aus Tabelle 4 hervor und ist in Abbildung 5 und 6 graphisch dargestellt.

Tab. 4: E₅₄₂ und E₆₂₆ bei Zusatz von Cupfer(II)- bzw. Natriumacetat

Zusatz	E	Expositionszeit (h)				
		0	1	2	3	4
Na-acetat	542	0,000 0,010	0,041 0,008	0,069 0,009	0,110 0,012	0,175 0,022
	626	0,000 0,000	0,004 0,000	0,007 0,000	0,010 0,000	0,016 0,002
Cu(II)-acetat	542	0,000 0,002	0,069 0,008	0,103 0,008	0,358 0,046	1,302 0,177
	626	0,000 0,000	0,020 0,002	0,026 0,002	0,063 0,007	0,157 0,022

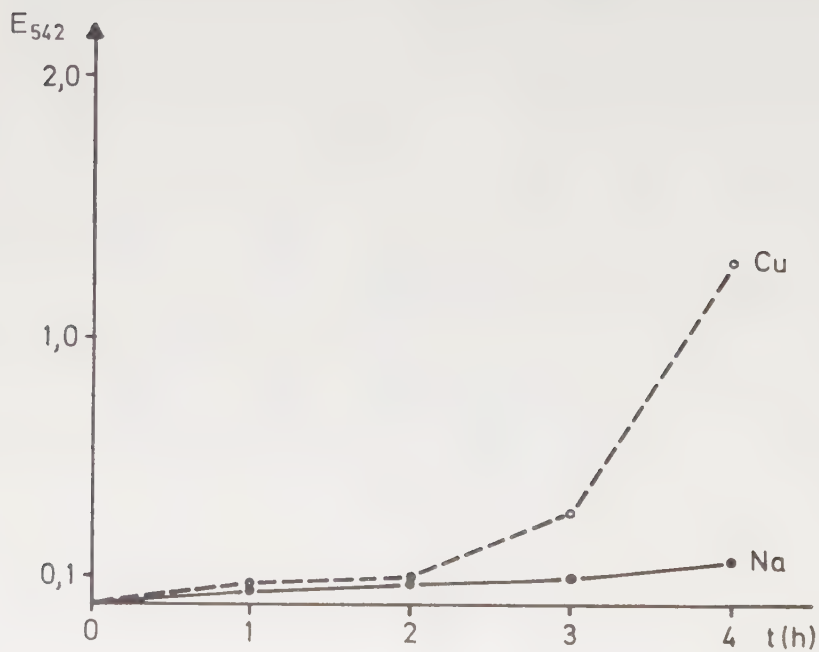


Abb. 5: E_{542} bei Zusatz von Natriumacetat und Cupferacetat

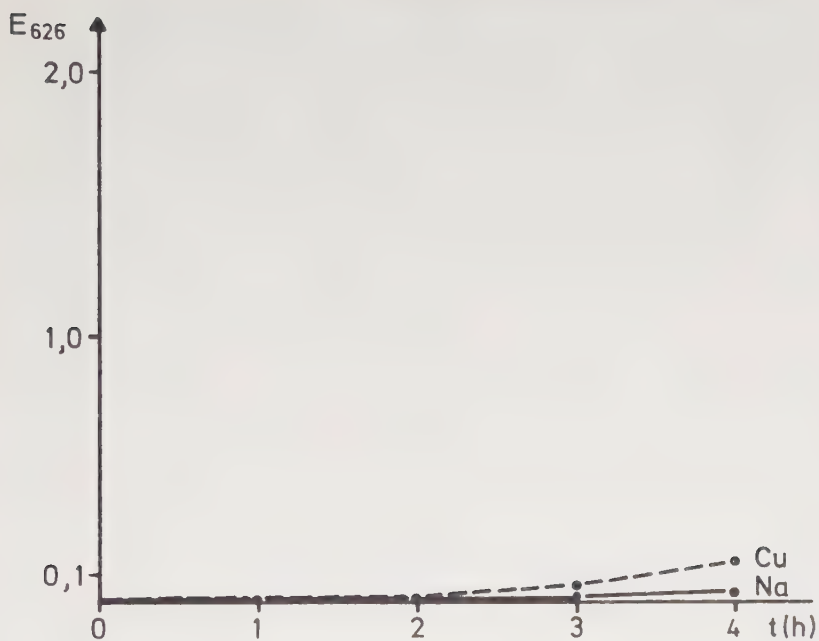


Abb. 6: E_{626} bei Zusatz von Natriumacetat und Cupferacetat

Die statistische Auswertung von Tabelle 4 (t-Test für $\sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$) zeigt, daß die E_{542} bei Zusatz von Cupfer(II)-acetat nach 3- und 4-stündiger Expositionszeit signifikant höher ist ($p < 0,001$) als bei Zusatz von Natriumacetat. Dasselbe Verhalten zeigt auch die E_{626} mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,01$.

3.3. Extinktionsentwicklung durch Cupfer(II)acetat und Reduktionsmittel

Über die Cupfer(II)acetatwirkung bei Zusatz verschiedener Reduktionsmittel orientieren die Tabellen 5 und 6. Die dort zusammengefaßten Ergebnisse sind in den Abbildungen 7 und 9 graphisch dargestellt.

Die statistische Auswertung der Tabellen 5 und 6 wurde, wie für Tabelle 2 angegeben, durchgeführt und geht aus Abbildung 8 und 10 hervor.

Tab. 5: E₅₄₂ bei Zusatz von Cupfer(II)acetat und verschiedenen Reduktionsmitteln

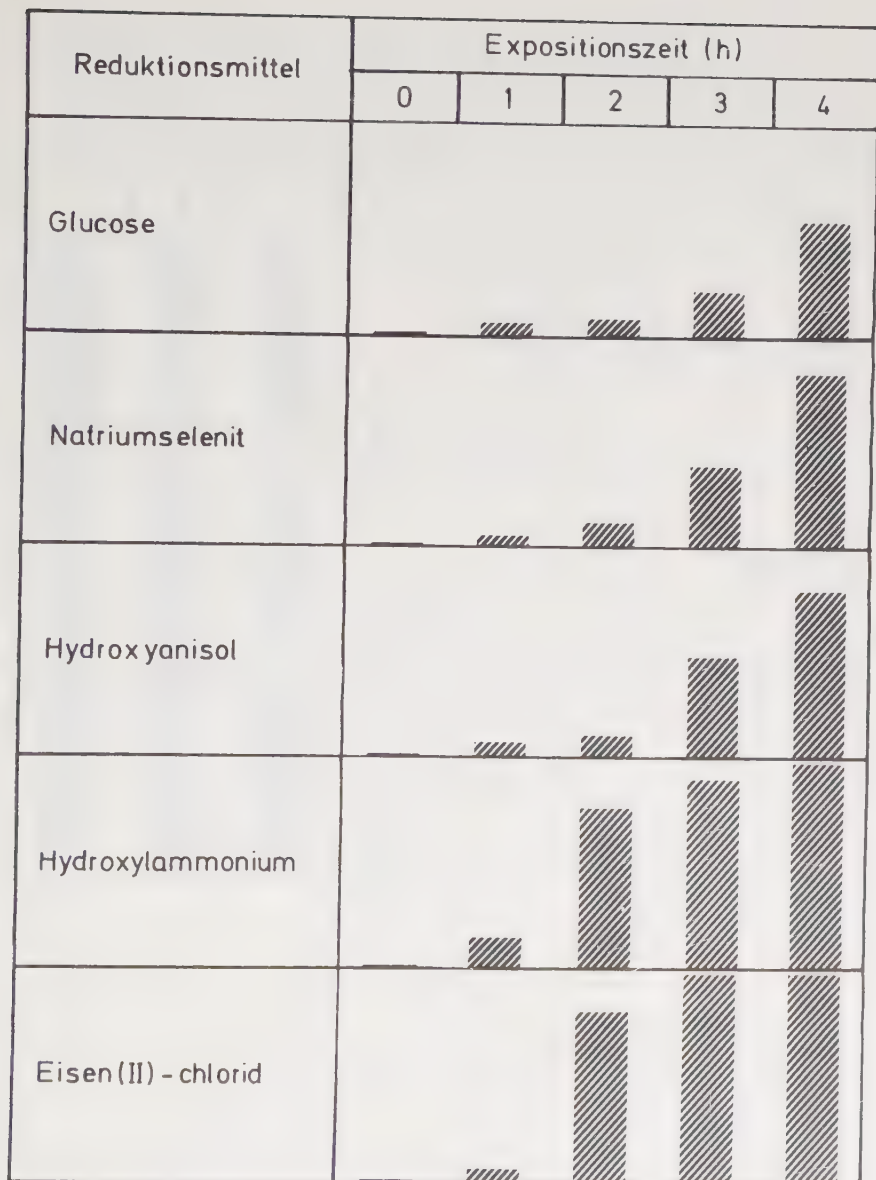
Reduktions- mittel	Expositionszeit (h)				
	0	1	2	3	5
Vitamin A	-0,001 0,002	0,055 0,005	0,099 0,005	0,181 0,023	0,509 0,121
Vitamin E	-0,003 0,002	0,035 0,005	0,076 0,005	0,260 0,057	0,843 0,147
Glutathion	0,011 0,004	0,097 0,008	0,197 0,039	0,290 0,051	0,757 0,173
Vitamin B ₁	0,004 0,004	0,085 0,007	0,154 0,021	0,548 0,166	0,998 0,181
ohne	0,000 0,002	0,069 0,008	0,103 0,008	0,358 0,046	1,302 0,177
Glucose	0,012 0,005	0,101 0,008	0,175 0,024	0,458 0,097	1,116 0,197
Natrium- selenit	-0,001 0,003	0,103 0,005	0,204 0,020	0,761 0,127	1,662 0,179
Hydroxy- anisol	0,038 0,010	0,132 0,009	0,206 0,017	0,976 0,207	1,609 0,179
Hydroxyl- ammonium	-0,001 0,006	0,299 0,077	1,512 0,201	1,804 0,119	1,966 0,000
Eisen(II)- chlorid	0,004 0,005	0,148 0,027	1,595 0,138	1,966 0,000	1,966 0,000
Natrium- ascorbat	0,018 0,006	0,324 0,031	1,946 0,020	1,966 0,000	1,966 0,000
Vitamin C	0,016 0,007	0,495 0,121	1,792 0,122	1,966 0,000	1,966 0,000
Hydrochinon	0,016 0,002	0,487 0,110	1,810 0,112	1,966 0,000	1,966 0,000

Tab. 6: E₆₂₆ bei Zusatz von Cupfer(II)acetat und verschiedenen Reduktionsmitteln

Reduktions- mittel	Expositionszeit (h)				
	0	1	2	3	4
Vitamin A	0,000 0,001	0,018 0,002	0,027 0,001	0,042 0,003	0,094 0,017
Vitamin E	0,000 0,000	0,010 0,002	0,020 0,001	0,047 0,008	0,100 0,012
Glutathion	0,006 0,001	0,022 0,002	0,039 0,005	0,065 0,009	0,113 0,019
ohne	0,000 0,000	0,020 0,002	0,026 0,002	0,063 0,007	0,157 0,022
Glucose	0,007 0,001	0,032 0,002	0,040 0,002	0,068 0,006	0,148 0,025
Vitamin B ₁	0,003 0,000	0,025 0,000	0,036 0,003	0,077 0,014	0,170 0,040
Natrium- selenit	-0,001 0,001	0,026 0,001	0,037 0,002	0,083 0,007	0,192 0,021
Hydroxy- anisol	0,009 0,003	0,029 0,003	0,036 0,003	0,109 0,019	0,253 0,046
Eisen(II)- chlorid	0,000 0,002	0,014 0,002	0,118 0,015	0,389 0,042	0,657 0,045
Vitamin C	0,008 0,003	0,026 0,005	0,196 0,032	0,423 0,045	0,709 0,054
Natrium- ascorbat	0,007 0,002	0,016 0,003	0,164 0,021	0,521 0,028	0,845 0,041
Hydrochinon	0,009 0,001	0,050 0,014	0,259 0,037	0,587 0,046	0,895 0,042
Hydroxyl- ammonium	0,001 0,003	0,052 0,006	0,278 0,050	0,683 0,102	0,989 0,104

Abb. 7: E₅₄₂ bei Zusatz von Cupfer(II)acetat und
Cupfer(II)acetat plus Reduktionsmitteln

Reduktionsmittel	Expositionszeit (h)				
	0	1	2	3	4
Vitamin A					
Vitamin E					
Glutathion					
Vitamin B ₁					
ohne					



Reduktionsmittel	Expositionszeit (h)				
	0	1	2	3	4
Natriumascorbat					
Vitamin C					
Hydrochinon					

 : E = 0,5

Aus Abbildung 8 läßt sich entnehmen, daß die durch Cupfer(II)acetat induzierte E_{542} durch Vitamin A, Vitamin E und reduziertes Glutathion erniedrigt, Vitamin B_1 und Glucose unbeeinflusst bleibt und durch die übrigen Reduktionsmittel signifikant erhöht wird.

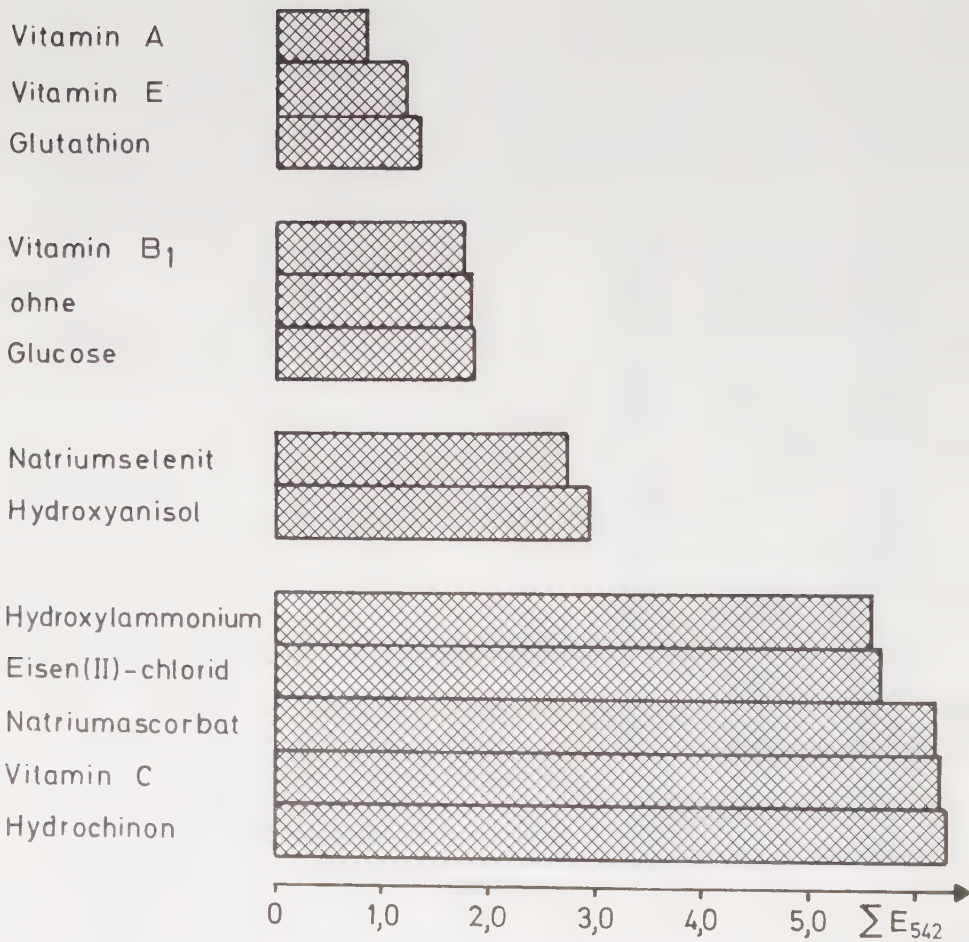


Abb. 8: Statistische Auswertung von Tabelle 5 (Säulenabstände kennzeichnen signifikante Unterschiede)

Abb. 9: E₆₂₆ bei Zusatz von Cupfer(II)acetat und Cupfer(II)-acetat plus Reduktionsmitteln

Reduktionsmittel	Expositionszeit (h)				
	0	1	2	3	4
Vitamin A					////
Vitamin E					////
Glutathion					////
ohne					////
Glucose					////

Reduktionsmittel	Expositionszeit (h)				
	0	1	2	3	4
Vitamin B ₁				////	////
Natriumselenit				////	////
Hydroxyanisol				////	////
Eisen(II)-chlorid			////	////	////
Vitamin C			////	////	////

Reduktionsmittel	Expositionszeit (h)				
	0	1	2	3	4
Natriumascorbat					
Hydrochinon					
Hydroxylammonium					

 : E = 0,5

Abbildung 10 zeigt, daß Vitamin A, Vitamin E und reduziertes Glutathion die durch Cupfer(II)acetat verursachte E_{626} signifikant erniedrigen, und daß Eisen(II)-chlorid, Ascorbinsäure und Natriumascorbat, sowie Hydrochinon und Hydroxylammonium eine Erhöhung machen. Durch die übrigen Reduktionsmittel bleibt die Extinktion unbeeinflusst.

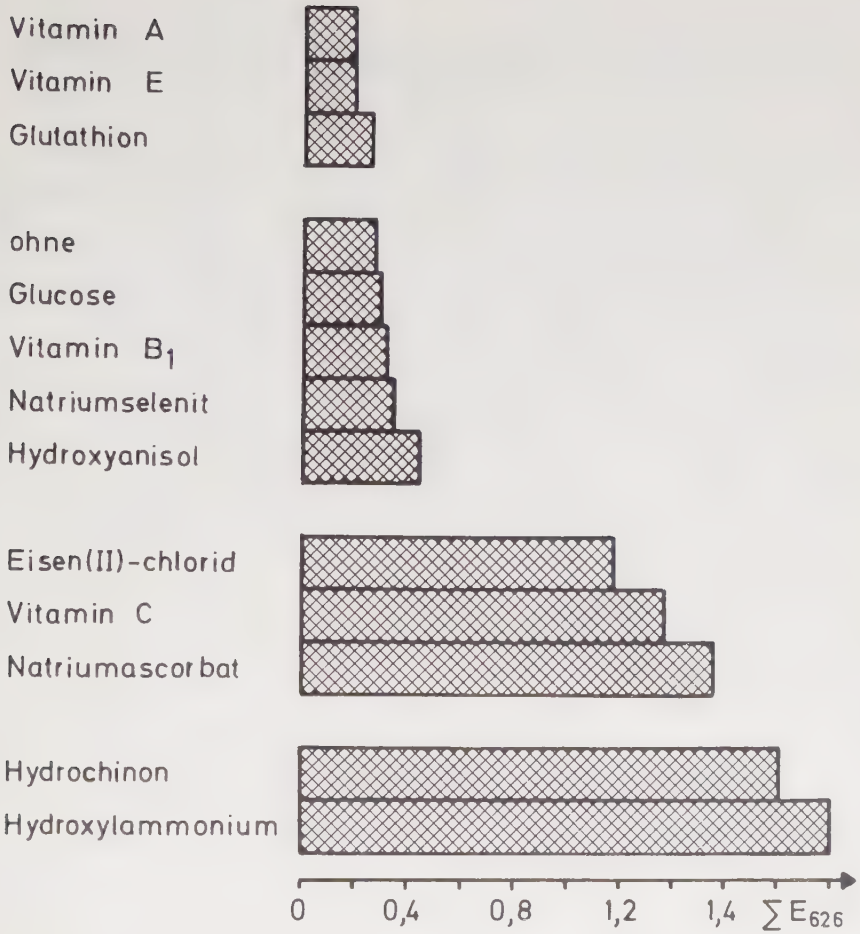


Abb. 10: Statistische Auswertung von Tabelle 6 (Säulenabstände kennzeichnen signifikante Unterschiede)

3.4. Konzentrationsabhängigkeit der Reduktionsmittelwirkungen

Zur weiteren Sicherung der beschriebenen Reduktionsmittelleffekte wurde deren Abhängigkeit von der Reduktionsmittelkonzentration an repräsentativen, therapeutisch interessanten Stoffen exemplarisch untersucht. Dazu wurden die beiden hemmenden Vitamine A und E, sowie das stark stimulierende Vitamin C ausgewählt und deren Konzentration im Ansatz um den Faktor 2, 4 und 8 (ausgenommen das bei achtfacher Konzentration ausfallende Vitamin A) erhöht.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 und 8 zusammengefaßt, und in Abbildung 11 und 12 veranschaulicht.

Die Auswertung von Tabelle 7 erfolgte wie bei Tabelle 2 beschrieben, und geht aus Abbildung 13 und 14 hervor.

Tab. 7: E₅₄₂ bei Zusatz von Cupfer(II)acetat und Reduktionsmitteln in verschiedenen Konzentrationen

Vitamin	C(a)	Expositionszeit (h)				
		0	1	2	3	4
A	1	0,000 0,002	0,055 0,005	0,099 0,005	0,181 0,023	0,509 0,121
		0,010 0,006	0,058 0,013	0,099 0,021	0,149 0,027	0,306 0,054
	4	0,017 0,011	0,045 0,015	0,073 0,018	0,122 0,020	0,263 0,045
	2	0,001 0,004	0,018 0,004	0,050 0,006	0,202 0,055	0,750 0,177
E	1	-0,003 0,002	0,035 0,005	0,076 0,005	0,260 0,057	0,843 0,147
	4	-0,005 0,003	0,005 0,002	0,128 0,041	1,382 0,223	1,916 0,050
	8	-0,006 0,003	0,003 0,002	0,906 0,242	1,966 0,000	1,966 0,000
C	1	0,016 0,007	0,495 0,121	1,792 0,122	1,966 0,000	1,966 0,000
	2	0,006 0,004	0,351 0,040	1,909 0,045	1,966 0,000	1,966 0,000
	4	0,033 0,007	0,269 0,044	1,737 0,094	1,966 0,000	1,966 0,000
	8	0,005 0,004	0,170 0,029	1,507 0,148	1,966 0,000	1,966 0,000

(a) Konzentration mal $1,258 \times 10^{-4}$ Mol/Liter Versuchsansatz

Tab. 8: E₆₂₆ bei Zusatz von Cupfer(II)acetat und Reduktionsmitteln in verschiedenen Konzentrationen

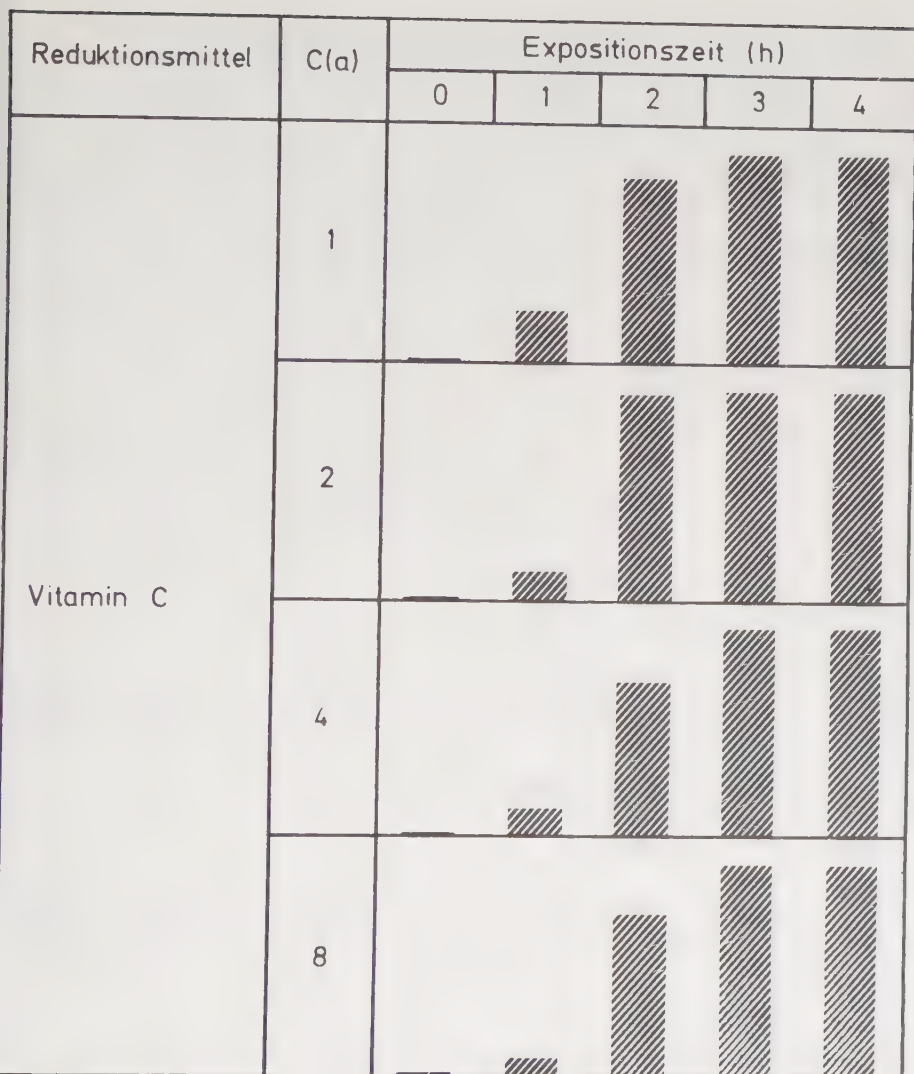
Vitamin	C(a)	Expositionszeit (h)				
		0	1	2	3	4
A	1	0,000 0,001	0,017 0,002	0,026 0,001	0,042 0,003	0,094 0,017
	2	0,004 0,002	0,021 0,004	0,032 0,006	0,043 0,007	0,077 0,012
	4	0,007 0,003	0,021 0,007	0,029 0,008	0,040 0,008	0,070 0,011
E	1	0,000 0,000	0,010 0,002	0,020 0,001	0,047 0,008	0,100 0,012
	2	0,000 0,001	0,007 0,001	0,013 0,000	0,033 0,005	0,094 0,018
	4	0,000 0,001	0,003 0,000	0,022 0,004	0,176 0,036	0,479 0,064
	8	0,000 0,000	0,004 0,000	0,090 0,023	0,453 0,058	0,823 0,047
C	1	0,008 0,003	0,026 0,005	0,196 0,032	0,423 0,045	0,709 0,054
	2	0,000 0,001	0,011 0,001	0,137 0,022	0,409 0,044	0,683 0,051
	4	0,007 0,002	0,017 0,002	0,110 0,014	0,298 0,022	0,578 0,042
	8	-0,002 0,000	0,005 0,001	0,121 0,017	0,336 0,031	0,602 0,054

(a) Konzentration mal $1,258 \times 10^{-4}$ Mol/Liter Versuchsansatz

Abb. 11: E₅₄₂ bei Zusatz von Cupfer(II)acetat und
Reduktionsmitteln in verschiedenen Konzentrationen

Reduktionsmittel	C(a)	Expositionszeit (h)				
		0	1	2	3	4
Vitamin A	1					
	2					
	4					

Reduktionsmittel	C(a)	Expositionszeit (h)				
		0	1	2	3	4
Vitamin E	1					
	2					
	4					
	8					

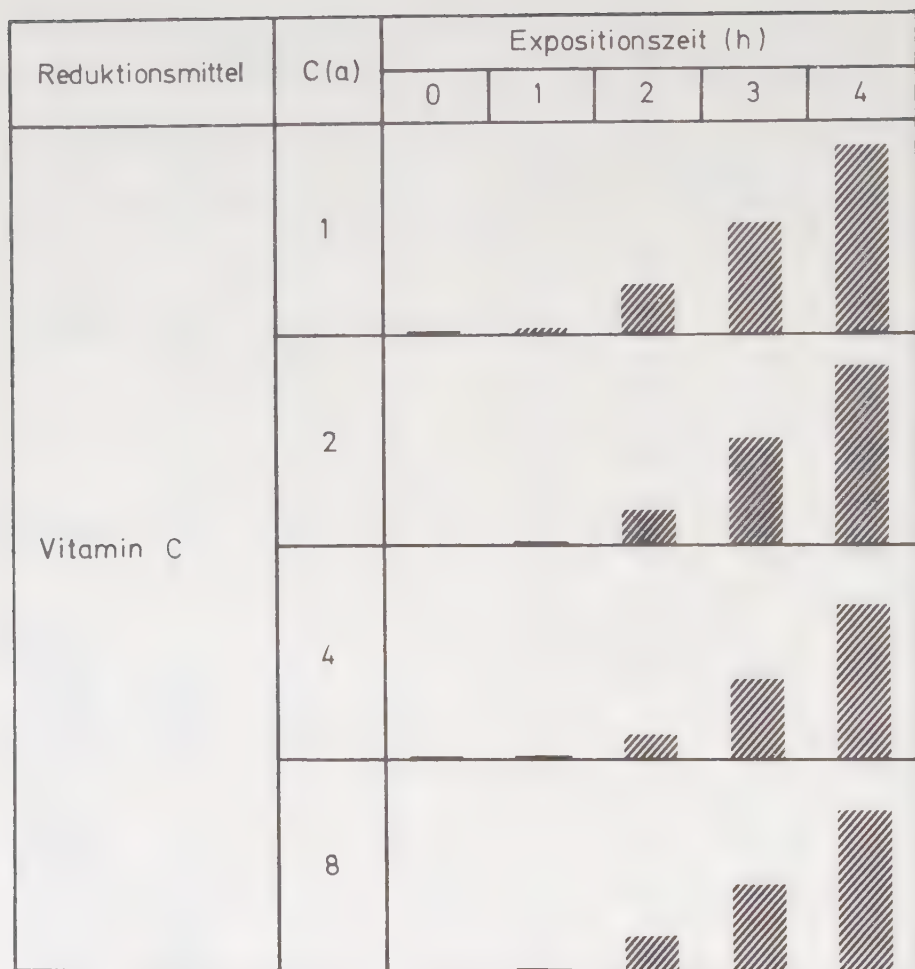


 : E = 0,5

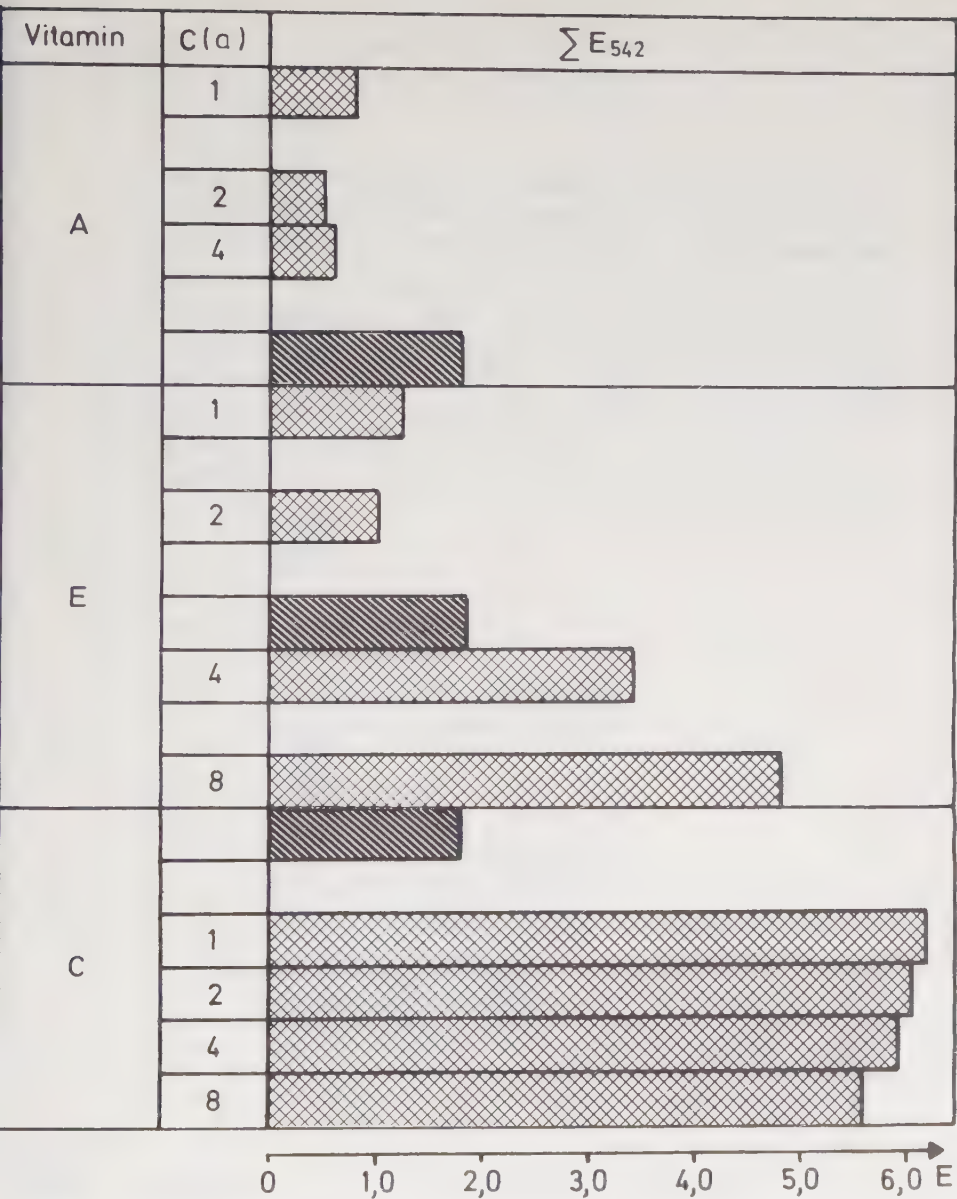
Abb. 12: E₆₂₆ bei Zusatz von Cupfer(II)acetat und Reduktionsmitteln in verschiedenen Konzentrationen

Reduktionsmittel	C (a)	Expositionszeit (h)				
		0	1	2	3	4
Vitamin A	1					
	2					
	4					

Reduktionsmittel	C(a)	Expositionszeit (h)				
		0	1	2	3	4
Vitamin E	1					
	2					
	4					
	8					



 : E = 0,2



 : Cupfer(II)-acetat; (a) : Konzentrationsfaktor

Abb. 13: Statistische Auswertung von Tabelle 7 (Säulenabstände kennzeichnen signifikante Unterschiede)

Aus Abbildung 13 geht hervor, daß Vitamin A die Cupferwirkung (E_{542}) dosisabhängig erniedrigt und Vitamin C eine dosisunabhängige Erhöhung hervorbringt. Vitamin E wirkt bei einfacher Konzentration und einer Konzentrationsverdoppelung hemmend, läßt die Cupferwirkung bei vierfacher Konzentration unbeeinflusst und verstärkt sie bei einer Konzentrationserhöhung um den Faktor acht. Es macht damit - im Gegensatz zu den beiden anderen Vitaminen - nicht nur eine quantitative, sondern auch eine qualitative Beeinflussung der Cupferwirkung im Sinne einer Wirkungsumkehr.

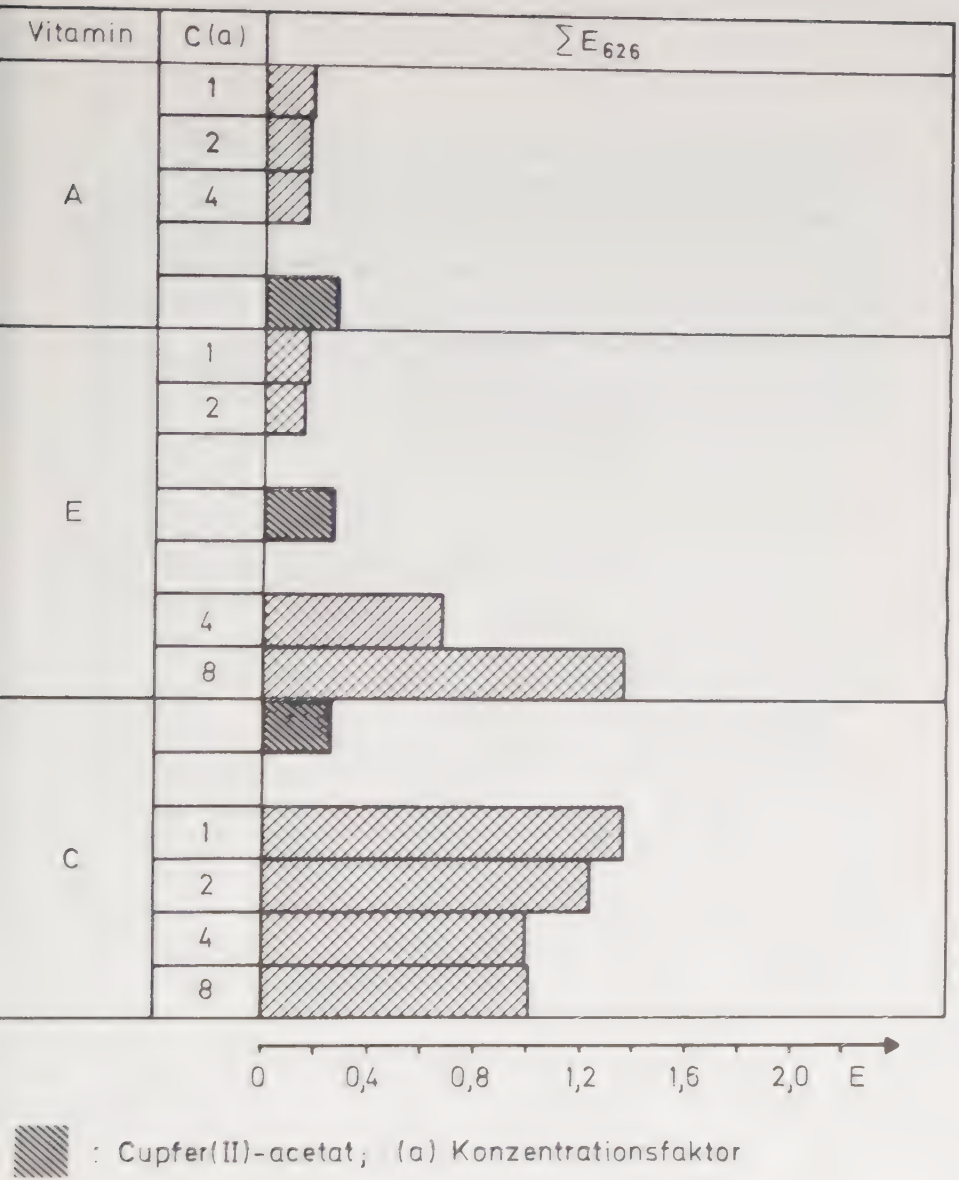


Abb. 14: Statistische Auswertung von Tabelle 8 (Bilanz-
versuche) hinsichtlich des Kupfer(II)-acetat-Einsatzes

Abbildung 14 zeigt, daß Vitamin A in allen untersuchten Konzentrationen zwar eine Hemmung der Cupferwirkung (E_{626}) verursacht, jedoch keine Dosisabhängigkeit erkennen läßt.

Vitamin E hemmt die Cupferwirkung bei ein- sowie zweifacher, und stimuliert sie bei vier- und achtfacher Konzentration, ohne daß je eine Dosisabhängigkeit vorliegt.

Vitamin C macht in allen untersuchten Konzentrationen eine Verstärkung der Cupferwirkung.

IV. DISKUSSION

Aus den dargelegten Untersuchungsbefunden ergibt sich zunächst, daß die vierstündige Inkubation von isotonisch verdünntem Pattenblut eine zeitabhängige leichte Hämolyse und Methämoglobinbildung zur Folge hat. Daß es sich dabei - trotz der geringgradigen Ausprägung - um echte Effekte handelt, wird durch die Zeitabhängigkeit, die stets gleichsinnige Änderung (Zunahme, beider Vorgänge mit fortschreitender Inkubationsdauer und die relativ geringe Streuung der Meßwerte unterstrichen (s. dazu Tabelle 4 und Abbildung 5 und 6).

Die Methämoglobinbildung ist eine Oxidation des Häm-gebundenen zweiwertigen Eisens zu dreiwertigem, welche sowohl in vivo (BANASCHAK: 4) als auch in vitro (BANASCHAK: 4) spontan stattfindet. Und auch die Hämolyse beruht nach LÖHR und WALLER (57) letzten Endes auf einer Oxidation, vor allem der SH-Gruppe von Enzymen (Dehydrogenasen, Kinasen, Phosphatasen etc.) und Strukturproteinen, wenn eine Störung oder Erschöpfung des Energiestoffwechsels (hier des Pentosephosphatcyclus, der Erythrocyten vorliegt. Es kommt dann zu einem Abfall der intrazellulären NADPH- und damit der GSH-Konzentration (GSH: reduziertes Glutathion) mit einem Wegfall des intrazellulären Oxidationsschutzes. Man kann sich die antioxidative Schutzfunktion des GSH am Beispiel des Wasserstoffperoxids folgendermaßen veranschaulichen:



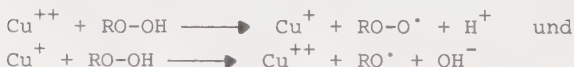
Die Spontanhämolyse und -methämoglobinbildung wurde - wie aus Tabelle 4 sowie Abbildung 5 und 6 weiter hervorgeht -

bei drei- und vierstündiger Inkubation der Erythrocyten in einer $1,2 \times 10^{-4}$ molaren Cupfer(II)konzentration signifikant gesteigert und bestätigt damit frühere Untersuchungen von SCHMID und STEINER (80) sowie STEINER (83).

Dies ist ein Phänomen, das offenbar auch in vivo bei der "hämolytischen Krise" der chronischen Cupfervergiftung wachsender Wiederkäuer auftritt, wo mit dem plötzlichen Anstieg des Cupferspiegels im Blut (nach Cupferfreisetzung aus der schwer geschädigten Leber) bis zu einer Konzentration von rund 4×10^{-4} Mol pro Liter eine massive Hämolyse und Methämoglobinbildung vergesellschaftet ist.

Nach dem oben Gesagten liegt es nahe, die Cupferwirkungen als eine Stimulation der zu Hämolyse und Methämoglobinbildung führenden Oxidationsvorgänge zu interpretieren. Sie ist vorstellbar

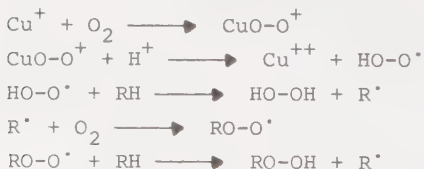
a) als Peroxidzerlegung mit Bildung oxidativer aggressiver Radikale:



in Anlehnung an PRYOR (70)

oder

b) als "Induktion" von Radikalen, Peroxidradikalen, Hydroperoxiden und Peroxiden einschließlich Wasserstoffperoxid:



in Anlehnung an SMITH and DUNKLEY (81).

Auch SCHMID und STEINER (80) interpretieren die Cupferwirkungen auf Erythrocyten als oxidative Schädigung via Radikalbildung.

Ein Vergleich der Tabellen 5 und 6 mit den Tabellen 2 und 3 sowie Tabelle 4 zeigt, daß die Cupferwirkungen durch eine Reihe sehr heterogener Stoffe im Sinne einer Hemmung oder Stimulation modifiziert werden. Gemeinsame Eigenschaften dieser Stoffe ist eine relativ geringe Elektronenaffinität; sie sind deshalb in dieser Arbeit auch als "Reduktionsmittel" bezeichnet worden.

Die Steigerung der hämolytischen und methämoglobinbildenden Cupferwirkungen geht bei den meisten Reduktionsmitteln weit über die Summe der Eigenwirkungen des Cupfers (Tabelle 4) und der Reduktionsmittel (Tabelle 2 und 3) hinaus, stellt also eine echte Stimulation - nicht eine einfache Wirkungsaddition - dar. Dies ist ein überraschendes Ergebnis, da es mit anderen Worten bedeutet, daß Oxidationsvorgänge durch Reduktionsmittel verstärkt werden. SCHMID (78) hat diesen Befund auch mit Ascorbinsäure und Cystein erhalten und in Anlehnung an SMITH und DUNKLEY (81) mit einer Reduktion des Cu^{++} zu Cu^+ im Sinne folgender Gleichungen erklärt (AH_2 :Ascorbinsäure):



mit Fortsetzung nach dem oben unter b) dargestellten Reaktionsschema. Auch andere Autoren (70) halten die reduzierte Form von Schwermetallionen für sehr wirksame Katalysatoren von Oxidationsvorgängen.

Damit stellt sich die Reduktion des Cu^{++} als der entscheidende geschwindigkeitsbegrenzende Vorgang für die Verstärkung der Cupferwirkungen durch Reduktionsmittel dar.

Diese Erkenntnis erschließt auch das Verständnis für die beobachteten o. e. Cupferwirkungen:

- Die Stimulantien der Cupferwirkungen haben ein Redoxpotential (Eh'), welches unter den Versuchsbedingungen negativer

- ist als das Potential des Redoxsystems $\text{Cu}^+ \longrightarrow \text{Cu}^{++}$,
- die indifferenten Stoffe beeinflussen die Reaktion $\text{Cu}^{++} \longrightarrow \text{Cu}^+$ offensichtlich nicht und
 - die Hemmstoffe besitzen ein Redoxpotential, welches positiver als das des Cupfersystems ist. Hinzu kommt bei Vitamin E und A, daß sie aufgrund ihrer Molekülstruktur wahrscheinlich in der Lage sind, Radikale zu quenchen ("auszulöschen") (79).

Wenn diese Interpretation der Versuchsergebnisse richtig ist, muß sie auch mit der Wirkungsumkehr des Vitamins E bei vier- bzw. achtfacher Konzentrationserhöhung (Tabelle 7 und 8) vereinbar sein: Offensichtlich ist das Redoxpotential des Vitamins E in einer dem Cupfer äquimolaren und doppelt äquimolaren Konzentration etwas positiver als das Potential des Cupfersystems und wird dann durch die Erhöhung der Vitamin E-Konzentration negativer als dieses. Eine solche Potentialänderung in Abhängigkeit von der Konzentration ist vorstellbar, da das Redoxpotential dem Logarithmus des Verhältnisses der molaren Konzentration der oxidierten Stufe ($[\text{Ox}]$) und der reduzierten Stufe ($[\text{Red}]$) proportional ist:

$$E_h' \sim \lg \frac{[\text{Ox}]}{[\text{Red}]} \text{ V}$$

und Vitamin E bei einer Konzentrationserhöhung sicherlich zu einem höheren Anteil in der reduzierten Form vorliegt als bei niedriger Konzentration. Dies beruht darauf, daß ein vom Untersuchungssystem abhängiger *k o n s t a n t e r* Anteil des in reduzierter Form applizierten Vitamins zunächst oxidiert wird, welcher bei weiterer Vitaminzugabe (Konzentrationserhöhung) *r e l a t i v* immer kleiner wird. Die Folge ist - wie die obige Beziehung zeigt - eine Abnahme des Redoxpotentials, welche offenbar ausreicht zur Reduktion des Cu^{++} .

Für die therapeutische Verwendung von Reduktionsmitteln zur Behandlung der chronischen Cupfervergiftung ergibt sich aus den vorliegenden Ergebnissen die Schlußfolgerung, daß nur Stoffe geeignet sind, welche unter biologischen Verhältnissen

- a) ein positiveres Redoxpotential haben als das $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{++}$ -System und
- b) Radikale abzufangen vermögen.

Beide Bedingungen könnten von Vitamin E und A in geeigneter Dosierung erfüllt werden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wird von experimentellen Untersuchungen über die Beeinflussbarkeit der cupferinduzierten Hämolyse und Methämoglobinbildung durch "Reduktionsmittel" berichtet.

Die Versuche sind mit Rattenblut durchgeführt worden, das nach Verdünnung in $1,2 \times 10^{-4}$ molarer Cupfer(II)acetat- und äquimolaren Reduktionsmittelkonzentrationen vier Stunden lang bei 37°C inkubiert worden war. Vitamin A wurde auch in zwei- und vier-, die Vitamine C und E in zwei-, vier- und achtfach höherer Konzentration eingesetzt.

Versuchsparameter war der Extinktionsanstieg der zellfreien Inkubationslösung bei 542 nm (Hämolyse) und 626 nm (Methämoglobinbildung).

Die Versuche führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Bei äquimolarer Reduktionsmittelkonzentration wird die Hämolyse von Vitamin A, Vitamin E und reduziertem Glutathion gehemmt. Glucose und Vitamin B₁ ergeben keine Beeinflussung. Natriumselenit = butyliertes Hydroxyanisol < Hydroxylammoniumchlorid = Eisen(II)chlorid = Natriumascorbat = Vitamin C = Hydrochinon steigern die hämolytische Cupferwirkung.
2. In höherer Konzentration wird die Hämolyse von Vitamin A gehemmt. Dies ist auch bei Vitamin E in doppelt äquimolarer Konzentration der Fall; eine Konzentrationserhöhung um den Faktor vier ergibt dagegen eine Stimulation der Hämolyse, die bei abermaliger Verdoppelung weiter ansteigt.

3. Die methämoglobinbildende Cupferwirkung wird bei äquimolarer Reduktionsmittelkonzentration durch Vitamin A, Vitamin E und reduziertes Glutathion gehemmt, bleibt durch Glucose, Vitamin B₁, Natriumselenit und butyliertes Hydroxyanisol unbeeinflusst und wird durch Eisen(II)chlorid = Vitamin C = Natriumascorbat < Hydrochinon = Hydroxylammoniumchlorid stimuliert.
4. In höherer Konzentration wird die Methämoglobinbildung von Vitamin A gehemmt. Gleichfalls hemmend wirkt Vitamin E bei einer Konzentrationsverdoppelung, während eine Erhöhung um den Faktor vier und acht die Methämoglobinbildung stimuliert. Denselben Effekt verursacht Vitamin C in allen Konzentrationen.
5. Die Wirkung der Hemmstoffe wird in der Diskussion mit einem positiveren Redoxpotential und radikalquenchenden Eigenschaften (Vitamin A und E), die der Stimulantien mit einem negativeren Redoxpotential als beim $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{++}$ -System erklärt; die Wirkungsumkehr des Vitamins E mit einem Redoxpotential in der Größenordnung des Cupfersystems und dessen konzentrationsabhängiger Erniedrigung.
6. Die Untersuchungen legen nahe, daß zur Antagonisierung der hämolytischen und methämoglobinbildenden Cupferwirkung offenbar nur solche Stoffe geeignet sind, welche ein positiveres Redoxpotential als $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{++}$ und möglichst radikalquenchende Eigenschaften besitzen.

SUMMARY

The present experimental study concerns the mode of influence of "reducing compounds" on Copper induced hemolysis and formation of methemoglobin.

The experiments are based upon rat blood diluted in a $1,2 \times 10^{-4}$ molar concentration of Copper(II)Acetate and in equimolar concentrations of reduced compounds incubated 4h/37°C. Vitamin A was also taken in two- and fourfold concentration and Vitamin C and Vitamin E in two-, four-, and eightfold concentration.

Parameter of the experiments was the increase in the extinction of the cell-free incubated solution at 542 nm (hemolysis) and 626 nm (methemoglobin-formation).

Results of the experiments:

1. In equimolar concentration of reducing compounds Vitamin A, Vitamin E and reduced Glutathione inhibit hemolysis, whereas Glucose and Vitamin B₁ don't show any influence. The hemolyzing effect of Copper is increased by Sodium Selenite = Butylated Hydroxyanisole < Hydroxylamine Hydrochloride = Ferrous Chloride = Sodium Ascorbate = Vitamin C = Hydroquinone.
2. In higher concentration hemolysis is inhibited by Vitamin A; the same effect is observed when Vitamin E is used in double equimolar concentration, whereas a fourfold elevation of concentration results in a stimulation of hemolysis, which can be increased by a further doubling of the concentration.

3. In equimolar concentration of reducing compounds the methemoglobin producing effect of Copper is inhibited by Vitamin A, Vitamin E and reduced Glutathione, is not influenced by Glucose, Vitamin B₁, Sodium Selenite and Butylated Hydroxyanisole but is stimulated by Ferrous Chloride = Vitamin C = Sodium Ascorbate < Hydroquinone = Hydroxylamine Hydrochloride.
4. In higher concentration the formation of methemoglobin is inhibited by Vitamin A. The same effect is observed by using Vitamin E in double equimolar concentration, whereas a fourfold and eightfold concentration of those compounds stimulate methemoglobin-formation. Vitamin C shows the same effect in all concentrations.
5. In the discussion the effect of the inhibitors is explained by a more positive redoxpotential and radical quenching properties (Vitamin A and E), that of the stimulators by a more negative redoxpotential than that of the $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{++}$ system and the reverse of the effect of Vitamin E by a redoxpotential on the same level as the Copper system and its decrease due to the concentration.
6. The study shows, that only compounds with a more positive redoxpotential than that of $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{++}$ and radical quenching properties are suited to antagonize the hemolytic and methemoglobin producing effect of Copper.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 ALLEN, D.W., J.H. JANDL
Oxidative hemolysis and precipitation of hemoglobin.
II. Role of thiols in oxidant drug action
J. clin. Invest. 40, 454, 1960
- 2 BAKER, N., L. WILSON
Inhibition of tumor glykolysis by hydrogen peroxide
formed from auto-oxidation of unsaturated fatty acids
Biochem. Biophys. Res. Comm. 11, 60, 1963
- 3 BANASCHAK, H., A.K. HÄNEL
Über den Mechanismus der Fixation von Methylenblau
an die Erythrocytenoberfläche
Acta biol. med. germ. 12, 90, 1964
- 4 BANASCHAK, H.
Exogene Methämoglobinämien
in: Fortschritte der Hämatologie, Bd. I
Hsg.: Perlich E., W. Plenert, O. Prokop
Leipzig, Joh. Ambros. Barth, 1971
- 5 BENNET, J.M., J.F. DESTORGES
Quinine induced hemolysis: Mechanism of action
Brit. J. Haematol. 13, 706, 1967
- 6 BERNHEIM, F., M.L.C. BERNHEIM, K.M. WILBUR
The reaction between thiobarbituric acid and the
oxidation products of certain lipids
J. Biol. Chem. 174, 257, 1948

- 7 BEUTLER, E., M. ROBSON, E. BUTTENWIESER
The mechanism of glutathione destruction and
production in drug-sensitive and nonsensitive
erythrocytes
J. clin. Invest. 36, 617, 1957
- 8 BEUTLER, E.
Drug induced hemolytic anemia
Pharm. Rev. 21, 73, 1969
- 9 BIELKA, H.
Molekulare Biologie der Zelle
Stuttgart, G. Fischer , 1969
- 10 BODANSKY, O.
Methemoglobinemia and methemoglobin producing
compounds
Pharm. Rev. 3, 144, 1951
- 11 BULL, L.B.
Copper poisoning of sheep
in: International Encyclopedia of Veterinary Medicine
Vol II, p. 701
Edinburgh, Green and Sons, 1966
- 12 CHABEREK, S., A.E. MARTELL
Organic sequestering agents
2nd Ed., p. 429
New York, John Wiley and Sons, 1959

- 13 COHEN, G., P. HOCHSTEIN
Glucose-6-phosphate dehydrogenase and detoxification
of hydrogen peroxide in human erythrocytes
Science 134, 1756, 1961
- 14 COHEN, G., P. HOCHSTEIN
Glutathion peroxidase: the primary agent for the
elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes
Biochemistry 2, 1420, 1963
- 15 COOPER, R.A., J. SHATTIL
Mechanism of hemolysis. The minimal red cell defect.
N. Engl. J. Med. 285, 1514, 1971
- 16 CORNBATH, M.
Studies of tocopherol-deficiency in infants and
children.
I. Hemolysis of erythrocytes in hydrogen peroxide
Am. J. Dis. Children 90, 669, 1955
- 17 DAVSON, H., J.F. DANIELLI
The permeability of natural membranes
Cambridge, University Press, 1943
- 18 DEMOPOULOS, H.B.
The basis of free radical pathology
Fed. Proc. 32, 1859, 1973
- 19 DESAI, I.D., A.L. TAPPEL
Damage to proteins by peroxidized lipid
J. Lipid Res. 4, 204, 1963

- 20 ERICH, C., H.D. WALLER
SH-Verbindungen in Erythrozyten nach in vivo Ver-
giftungen
Klin. Wschr. 45, 983, 1967
- 21 FAIRBANKS, V.F.
Hämolytische Anämie durch Cupfersulfat
Archs. int. Med. 120, 428, 1967
- 22 FIELDING, J.
The hemolytic activity in an iron carbohydrate complex
J. clin. Path. 16, 12, 1962
- 23 FIRKIN, B.G., J.S. WILEY
The red cell membrane and its disorders
Progr. Hematology 5, 26, 1966
- 24 FRÖHLICH, E.D.
Altered regulatory mechanisms in disease
Pathophysiology
Toronto, Philadelphia, J. B. Lippincott Company, 1972
- 25 GEHRMANN, G.
Hämolyse und hämolytische Anämien
Stuttgart, G. Thieme, 1969
- 26 GINN, F.L., P. HOCHSTEIN, B.F. TRUMP
Membrane alteration in hemolysis: Internalization
of plasmalemma induced by primaquine
Science 164, 843, 1969
- 27 GOLDBERG, L., L.E. MARTIN, A. BATCHELOR
Biochemical changes in the tissues of animals injected
with iron. 3. Lipid peroxidation
Biochem. J. 83, 291, 1962

- 28 GROSS, R.T., R. BRACCI, N. RUDOLPH, E. SCHROEDER,
J.A. KOCHEN
Hydrogen peroxid toxicity and detoxification in
the erythrocytes of new-born infants
Blood 29, 481, 1967
- 29 HÄNEL, A.K.
Das Verhalten des reduzierten Glutathions im Erythro-
zyten bei der Heinz-Körper-Bildung
Folia haem. 78, 676, 1961/62
- 30 HÄNEL, A.K.
Über die toxische Wirkung von Methylenblau auf Ery-
throzyten in vivo
Acta biol. med. germ. 12, 644, 1964
- 31 HEIKKILÄ, R.E., J.A. MEZICK, C.D. CORNWELL
Destruction of specific membrane phospholipids during
peroxidative hemolysis of vit.E-deficient erythrocytes
Phys. chem. Phys. 3, 93, 1971
- 32 HOCHSTEIN, P., M. MARTINEZ, G. COHEN
Generation of H_2O_2 during the reaction of nitrit
with oxyhemoglobin
Blood 25, 273, 1965
- 33 HOCHSTEIN, P.
In: Proc. 3rd. International Conference on Hyperbaric
Medicine 1965, p. 61
ed. by I.W. Brown, Jr. and B.G. Cox
Washington, D.C., Natl. Acad. Sci.
Natl. Res. Council, 1966

- 34 HOELZ-WALLACH, D.F., H.G. KNÜFERMANN
Plasmamembranen, Chemie, Biologie und Pathologie
Berlin, Springer , 1973
- 35 HOLLANDE, A.
Allgemeine Biologie Bd. I.
Struktur und Funktion der Zelle
Stuttgart, G. Fischer , 1971
- 36 HUNTER, F.E., A. SCOTT, P.E. HOFFSTEN, J.M. GEBICKI,
J. WEINSTEIN, A. SCHNEIDER
Studies of the mechanism of swelling, lysis and dis-
integration of isolated liver mitochondria exposed to
mixtures of oxidized and reduced glutathione
J. Biol. Chem. 239, 614, 1964
- 37 HUNTER, F.E., A. SCOTT, P.E. HOFFSTEN, F. GUERRA,
J. WEINSTEIN, A. SCHNEIDER, B. SCHULZ, J. FINK,
L. FORD, E. SMITH
Studies on the mechanism of ascorbate-induced swelling
and lysis of isolated liver mitochondria
J. Biol. Chem. 239, 604, 1964
- 38 JACOB, H.S., J.H. JANDL
Effects of sulphydryl inhibition on red blood cells
I. Mechanisms of hemolysis
J. clin. invest. 41, 779, 1962
- 39 JACOBS, H.S., S.H. INGBAR, J.H. JANDL, S.C. BELL
Oxidative hemolysis and erythrocyte metabolism in
hereditary acatalasia
J. clin. Invest. 44, 1187, 1965

- 40 JACOB, H.S., S.E. LUX
Degradation of membrane phospholipids and thiols
in peroxide hemolysis: Studies on Vit. E deficiency
Blood 32, 549, 1968
- 41 JACOB, H.S., K.H. WINTERHALTER
Mechanism of formation of Heinz-Bodies and their
attachment to red blood cell membranes in the
instable hemoglobinopathies
aus: VI. Intern. Symposium über Struktur und Funk-
tion der Erythrozyten
Berlin, Akademie, 1972
- 42 JANDL, H.J., L.K. ENGLE, D.W. ALLEN
Oxidative hemolysis and precipitation of hemoglobin
I. Heinz-Body anemias as an acceleration of red
cell aging
J. clin. Invest. 39, 1818, 1960
- 43 JUNG, F.
Nitrosobenzolhämoglobin
Naturwissenschaften 28, 264, 1940
- 44 JUNG, F.
Theorie der Chloratvergiftung
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Path. Pharm. 204, 267, 1943
- 45 JUNG, F.
In: Zur Pathologie der roten Blutzelle
IV. Mitteilung: Über die hämolytische Wirkung des
Arsenwasserstoffs
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Path. Pharm. 204, 604, 1943

- 46 JUNG, F.
Betrachtungen zur Struktur der Erythrozytenmembran
Folia haem. 90, 182, 1968
- 47 KANN, H.E., J.Ch.E. MENGEL, W.T. CLANCY, R. TIMMS
Effects of in vivo hyperoxia on erythrocytes
IV. Hemolysis after occurring exposure to oxygen
under high pressure
J. lab, clin. Med. 70, 150, 1967
- 48 KARLSON, T.
Kurzes Lehrbuch der Biochemie. 9. Auflage
Stuttgart, G. Thieme, 1974
- 49 KIESE, M.
Oxidation von Anilin zu Nitrosobenzol in vivo
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Path. Pharm. 236, 20, 1959
- 50 KIESE, M., K.H. PLATTIG
Hämoglobinbildung durch Benzoylphenylhydroxylamin
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Path. Pharm. 235, 360, 1959
- 51 KIESE, M.
The biochemical production of ferrihemoglobin-forming
derivates from aromatic amines and mechanisms of ferri-
hemoglobin formation
Pharm. Rev. 18, 1092, 1966
- 52 KLENK, E., K. LAUENSTEIN
Über die Glykolipoide und Sphingomyeline des
Stromas der Pferdeerythrozyten
Hoppe-Seylers Z. phy. Chem. 295, 164, 1953

- 53 LAMBDEN, M.P., R. KORSON, P. RICGO
Vit. C. effect of an oxidized diet
Proc. soc. Exp. Biol. Med. 137, 1249, 1971
- 54 LEMBERG, R., J.W. ZEGGE, H.W. LOCKWOOD
Coupled oxidation of ascorbic acid and Hb
Biochem. J. 33, 754, 1939
- 55 LEWIS, S.E., E.D. WILLS
Destruction of SH-groups of proteins and aminoacids
by peroxides of unsaturated fatty acids
Biochem. Pharm. 11, 901, 1962
- 56 LÖHR, G.W., P. BAUM, G. KAMM
Toxische und hämolytische Anämien
Med. Klin. 52, 2111, 1963
- 57 LÖHR, G.W., H.D. WALLER
Pharmakogenetik und Präventivmedizin
Stuttgart, G. Thieme, 1966
- 58 LOTTER, Gisela
Über die antioxidative Wirkung von Gewürzextrakten
und Gewürzextraktbestandteilen im Schweineschmalz
Med. vet. Diss., München, 1971
- 59 MARCHESI, V.T., R.C. JACKSON, J.P. SEGREST, I. KAHANE
Molecular feature of the major glycoprotein of the
human erythrocyte membran
Fed. Proc. 32, 1833, 1973
- 60 MELHORN, D.K., S. GROSS
Relationship between iron-dextran and vit. E in
iron deficiency anemia in children
J. lab. clin. med. 74, 789, 1969

- 61 MENGEL, Ch.E., H.E. KANN, W. WIRTH, B. SMITH, D. HORTON
Effects of in vivo hyperoxia on erythrocytes. I. Hemolysis in mice exposed to hyperbaric oxygenation
Proc.Soc. Exp. Biol. Med. 16, 259, 1964
- 62 MENGEL, Ch.E., H.E. KANN, J.A. HEYMANN, E. METZ
Effects on in vivo hyperoxia on erythrocytes. II. Hemolysis in a human after exposure to oxygen under high pressure
Blood J. Hematol. 25, 822, 1965
- 63 MENGEL, Ch.E., H.E. KANN
Effects on in vivo hyperoxia on erythrocytes. III. In vivo peroxidation of erythrocyte lipid
J. clin. Invest. 45, 1150, 1966
- 64 MEYER, H.W., H. WINKELMANN
Über die Anordnung der Membranproteine nach Untersuchungen mit der Gefrierätzung an isolierten Erythrocytenmembranen
Protoplasma 75, 255, 1972
- 65 MILLS, G.C.
Hemoglobin catabolism. I. Glutathion peroxidase, an erythrocyte enzyme, which protects hemoglobin from oxidative breakdown
J. biol. Chem. 229, 189, 1957
- 66 MILLS, G.C., H.R. RANDALL
Hemoglobin catabolism. II. The protection of hemoglobin from oxidative breakdown in the intact erythrocyte
J. biol. Chem. 232, 589, 1958

- 67 MOHRING, D.
Die Funktion der erythrozytären Membran
Folia haem. N.F. 9, 296, 1964
- 68 PASWELL, J., B.E. COHEN, J.B. BASSAT, B. RAMOT,
M. SHEHORY, K. LAVI
Hemolysis in Wilson's disease: The role of glucose-6-
phosphat dehydrogenase inhibition
Jsr. J. Med. Sci. 6, 549, 1970
- 69 PONDER, E.
Hemolysis and related phenomena
New York, Grune and Stratton, 1948
- 70 PRYOR, W.A.
Free radical reactions and their importance in
biochemical systems
Fed. Proc. 32, 1862, 1973
- 71 RAPOPORT, S.M., D. SCHEUCH
Glutathione stability and pyrophosphatase activity
in reticulocytes; direct evidence for the importance
of glutathione for the enzyme status in intact cells
Nature, 186, 967, 1960
- 72 REIN, H., O. RISTAU, E. KUPFER, F. JUNG
Nitrosohämoglobinämie bei der Vergiftung mit
Natriumnitrit
Folia haem. 90, 176, 1968
- 73 REYNOLDS, J.
Red cell membranes: Fact and fancy
Fed. Proc. 32, 2034, 1973

- 74 SCHEUCH, D., S.M. RAPOPORT
Glutathion und Triosephosphatdehydrogenase-Aktivität
in roten Blutzellen von Kaninchen
Klin. Wschr. 38, 757, 1960
- 75 SCHEUCH, D., S. RAPOPORT
Intrazelluläre Regulation der Aktivität einiger
SH-Enzyme durch Glutathion
Folia haem. 78, 349, 1962
- 76 SCHEUCH, D., K.H. JACOBASCH, A.K. HÄNEL, C. WAGEN-
KNECHT
Der Einfluß von Methylenblau auf Glutathion und die
Aktivität einiger SH-Enzyme
Acta biol. med. germ. 11, 616, 1963
- 77 SCHEUNERT, A., A. TRAUTMANN
Lehrbuch der Veterinärphysiologie
Berlin, Parey, 1965
- 78 SCHMID, A.
Untersuchungen über die chronische Cupfervergiftung
der Wiederkäuer: Beeinflussung der hämolytischen
und ferrihämoglobinbildenden Wirkung von Cu^{++} durch
Thiole und Reduktionsmittel
Arch. Pharmacol. 277 (Suppl.), R 66, 1973
- 79 SCHMID, A.
Schädigung der Erythrocytenmembran durch Prooxi-
dantien
Vortragsveranstaltung des SFB 147 am 5.3.74 in
München

- 80 SCHMID, A., K. STEINER
Untersuchungen über die chronische Cupfervergiftung
der Wiederkäuer; Ferrihämoglobinbildung durch Cu^{++}
im Blut von Mensch, Pferd, Rind, Kalb, Schaf, Schwein,
Hund, Meerschweinchen und Ratte
Arch. Pharmacol., 270 (Suppl.), R 98, 1972
- 81 SMITH, G.J., W.L. DUNKLEY
Initiation of lipid peroxidation by a reduced metal
ion
Arch. Biochem. 98, 46, 1962
- 82 SMITH, K.A., Ch.E. MENGEL
Association of iron-dextran induced hemolysis and
lipid peroxidation in mice
J. lab. clin. Med. 72, 505, 1968
- 83 STEINER, K.
Untersuchungen zum Mechanismus der Hämoglobinbildung
bei der chronischen Cupfervergiftung der Wiederkäuer
Med. vet. Diss. München, 1973
- 84 TAPPEL, A.L.
Lipid peroxidation damage to cell components
Fed. Proc. 32, 1870, 1973
- 85 TEITEL, P., I. MARCU, A. ZENAKIS
Erythrocyte microrheology: Its dependence on the
reduced sulfhydryl groups and hemoglobin integrity
Folia haem. 90, 281, 1968
- 86 TODD, J.R., R.H. THOMPSON
Methemoglobin in chronic copper poisoning of sheep
Nature 191, 89, 1961

- 87 TODD, J.R., R.H. THOMPSON
Studies on chronic copper poisoning
II. Biochemical studies on the blood during
the hemolytic crisis
Brit. vet. J. 119, 161, 1963
- 88 WAGNER, J., A. DAVID, J. SVBOVA
Glykolyse und GSH-Gehalt in Erythrocyten bei
methämoglobinbildenden Stoffen in vitro
Folia haem. 78, 661, 1961/62
- 89 WALLER, H.D.
Der Stoffwechsel der Erythrozyten und seine
Bedeutung für die Stabilisierung des Hb
Folia haem. NF 9, 259, 1964
- 90 WAYS, P., D.J. HANNAHAN
Characterization and quantification of red cell
lipids in normal man
J. Lipid Res. 5, 318, 1964
- 91 WEED, R.T., C.F. REED
Membrane alterations leading to red cell destruction
Am. J. Med. 41, 681, 1966
- 92 WEIGERT, P.
Der Einfluß von Auspuffgasen auf die Enzymaktivi-
täten im Serum von Ratten und Hunden
Med. vet. Diss., München, 1972
- 93 WEISS, E., P. BAUR, P. PLANK
Die chronische Kupfervergiftung des Kalbes
Vet. med. Nachr. 1, 35, 1967

- 94 WILLS, E.D.
Mechanism of lipid peroxide formation in animal
tissues
Biochem. J. 99, 667, 1965
- 95 WINNE, D.
Zur Auswertung von Versuchsergebnissen: Die Prü-
fung, ob Kurven sich in ihrem Verlauf unterscheiden
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharm. 250,
383, 1965
- 96 WHITTAM, R.
Transport and diffusion in red blood cells
London, Edward Arnold, 1964
- 97 WITTING, L.A.
Biological availability of tocopherol and other
antioxidants at the cellular level
Fed. Proc. 24, 912, 1965

Herrn Prof. Dr. A. Schmid bin ich für die Überlassung des Themas und die stets gewährte Unterstützung bei der Auswertung dieser Arbeit zu großem Dank verpflichtet.

Besonderer Dank gilt Frau M. Kußmaul für die Ausführung der graphischen Darstellungen.

VII. LEBENS LAUF

Geburtstag: 6-5-1948

Geburtsort: Landshut

Eltern: Dr. Karl Sprengler
Gertrud Sprengler, geb. Maluck

Familienstand: ledig

Schulausbildung: Nach Besuch der Volksschule Weiden i.d.Opf.
Übertritt in die Mädchen-Oberrealschule
Weiden, Abitur 1967

Studium: ab Wintersemester 1967 Studium der
Veterinärmedizin an der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München

Staatsexamen: 1972

Approbation: 1972

Seit 1.2.1974 Verwalterin der Dienstge-
schäfte eines wissenschaftlichen Assi-
stenten am Institut für Tierpathologie
des Fachbereichs Tiermedizin der Uni-
versität München

